

EVALUACIÓN DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS COMO ESPECIE BIOINDICADORA DE CONTA- MINACIÓN FECAL EN AGUA Y PECES EN LA CUENCA INFERIOR DEL RÍO SAN JUAN

VIRGINIA BIANCHI,¹ PATRICIA VARELA,²
DANIEL FLORES³ y PATRICIA DURANDO⁴

¹INIBIOMA, CONICET, Ruta prov. N° 61, km 3, CCP7, Junín de los Andes, Neuquén, Argentina.

²Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan, Av. Libertador General San Martín 1109 (Oeste), San Juan, Argentina. ³Gabinete de Geología Ambiental. Instituto de Geología. FCEF. Av. Ignacio de la Rosa y Meglioli 5400, San Juan, Argentina. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Ing. Agr.

Felix Aldo Marrone 746, Córdoba, Argentina. E-mail: pdurando@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se analizó: a) la presencia de *E. coli* en el agua recolectada en cuatro puntos del río San Juan (Pinar, San Martín, Albardón y Caucete); b) músculo e intestino de peces del género *Astyanax*, capturados en dichos sitios, a fin de determinar si actúan como reservorios de *E. coli* y c) si las cepas de *E. coli* aisladas del agua y/o de los tejidos de los peces posee resistencia a distintos antibióticos usados en medicina y veterinaria. Se detectó un aumento de la densidad de *E. coli* en el agua desde el Pinar hasta Caucete, con un incremento significativo en abril. Se aislaron cepas de *E. coli* del intestino de los peces capturados en Pinar en el mes de abril. En los otros sitios se detectó *E. coli* en el agua durante los meses de mayor temperatura, observándose invasión del tejido muscular en diciembre. En todos los sitios, se aislaron poblaciones de *E. coli* resistente a antibióticos, siendo la resistencia a ampicilina > colistina > amicacina/ cefalotina > nitrofurantoina/ácido nalidíxico > gentamicina/cloranfenicol. La presencia de *E. coli* resistente a antibióticos, tanto en agua como en peces, indicaría el deterioro de la cuenca inferior del Río San Juan por acción de la contaminación fecal.

Palabras clave:

biomonitoreo, contaminación fecal, resistencia a antibióticos.

EVALUATION OF *Escherichia coli* RESISTANT TO ANTIBIOTICS AS A BIOINDICATOR SPECIES OF FECAL POLLUTION IN WATER AND FISHES IN THE LOWER BASIN OF THE SAN JUAN RIVER

VIRGINIA BIANCHI,¹ PATRICIA VARELA,²
DANIEL FLORES³ & PATRICIA DURANDO⁴

¹INIBIOMA, CONICET, Ruta prov. N° 61, km 3, CCP7, Junín de los Andes, Neuquén, Argentina.

²Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan, Av. Libertador General San Martín 1109 (Oeste), San Juan, Argentina. ³Gabinete de Geología Ambiental. Instituto de Geología. FCFN. Av. Ignacio de la Rosa y Meglioli 5400, San Juan, Argentina. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Ing. Agr. Felix Aldo Marrone 746, Córdoba, Argentina. E-mail: pdurando@agro.unc.edu.ar

ABSTRACT

In this work the following was analyzed: a) presence of *E. coli* in water collected from four sites of the San Juan River (Pinar, San Martín, Albardón and Caucete); b) whether muscles and intestines of fishes of the genus *Astyanax*, captured at the sites mentioned above act as *E. coli* reservoirs, and c) if *E. coli*, isolated from water and/or fish tissue is resistant to different antibiotics used in Medicine and Veterinary Medicine. Bacterial density increased from the Pinar zone to Caucete, with a significant rise in the month of April. *E. coli* was isolated from the intestines of fishes captured in Pinar in April. At the other sites, *E. coli* was detected in the months of higher water temperature, and muscle tissue invasion was observed in December. *E. coli* populations resistant to antibiotics were detected at all the sites. They were resistant to ampicillin > colistin > amikacin/ cefalotin > nitrofurantoin/ nalidixic acid > gentamicin/chloramphenicol. The presence of *E. coli* resistant to antibiotics, both in water and in fishes, would indicate the contamination of the lower basin of the San Juan River due to fecal pollution.

Key words:

biomonitoring, fecal contamination, antibiotic resistance.

INTRODUCCIÓN

El análisis de la calidad bacteriológica del agua resulta de vital importancia tanto para el consumo humano y de animales (Gharibi *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012), como para el riego (Palese *et al.*, 2009, Pachepsky *et al.*, 2011) y las actividades de recreación (Kumar *et al.*, 2012). El vertido directo de efluentes cloacales deficientemente tratados o sin tratamiento y/o el arrastre pluvial superficial desde tierras costeras producen la aparición de bacterias entéricas en los cursos de agua (Plummer & Long, 2007, Kay *et al.*, 2008; Staley *et al.*, 2012).

Escherichia coli (*E. coli*) es la especie más abundante dentro del grupo de bacterias coliformes fecales, razón por cual es empleada, a nivel mundial, como especie bioindicadora de contaminación fecal (Peters, 2009; Daly *et al.*, 2013). Esta especie coloniza habitualmente la flora intestinal humana, de animales endotérmicos y de algunos grupos de reptiles (Enriquez *et al.*, 2001; Ramer *et al.*, 2007). Desde el punto de vista serológico, se han identificado cinco cepas de *E. coli* patógenas, productoras de brotes diarreicos severos en humanos y en animales endotérmicos: *E. coli* enterotoxígena, enteropatógena, enteroagregativa, enteroinvasiva y enterohemorrágica (Sullivan *et al.*, 2007).

La contaminación bacteriana en el agua representa no sólo un problema sanitario, sino también un serio riesgo ambiental (Berthe *et al.*, 2008). Una vez que las bacterias se distribuyen por el agua o los sedimentos del cauce de los ríos pueden penetrar a los organismos acuáticos por absorción a través del tegumento o de las branquias, captación de partículas suspendidas y/o por consumo de alimentos contaminados (van der Oost *et al.*, 2003; Dang & Dalsgaard, 2012). Cuando la concentración de *E. coli* en agua es lo suficientemente elevada puede infectar distintos órganos, tales como el tegumento, el músculo, las branquias y/o el hígado (El-Shafai *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2004; Dang & Dalsgaard, 2012).

Sumado a la presencia de bacterias patógenas entéricas, en el agua existen otros contaminantes de importancia sanitaria y ecológica, tal como los antibióticos utilizados en medicina y en veterinaria. La liberación constante de estas sustancias al ambiente produce una fuerte presión selectiva que favorece la proliferación de bacterias resistentes a ellos (Baquero *et al.*, 2008; Kemper, 2008; Martínez, 2009; Kümmerer, 2009, Wright, 2010) y altera la estructura poblacional de bacterias importantes en la dinámica ambiental (Costanzo, 2005). Las bacterias no patógenas, presentes en organismos vivos y en diferentes ambientes, actúan como reservorios de genes de resistencia para las bacterias patógenas que puedan adquirirlos. *E. coli*, en particular, posee una gran capacidad de adquisición y diseminación de genes de resistencia dentro del tracto digestivo y en ambientes acuáticos (Maal-Bared *et al.*, 2013).

Las bacterias resistentes llegan al suelo por derrame directo de heces, vertido de efluentes cloacales o al ser utilizadas como abono, transformándolo en un reservorio de

contaminantes, desde donde pueden mobilizarse por lixiviación hacia cuerpos de agua subterráneos, o por erosión y/o escorrentía hacia cuerpos de agua superficial (Kümmerer, 2009; Martínez, 2009). De esta manera, el consumo de agua y actividades relacionadas con el recurso hídrico, se convierten en vías de transmisión de genes de resistencia hacia las comunidades humanas, ya sea por manipulación o ingestión directa (Sarter *et al.*, 2007; Kemper, 2008; Su *et al.*, 2012).

En la provincia de San Juan, existen registros previos de la presencia de bacterias coliformes fecales en las aguas de la cuenca inferior del río San Juan y de sus afluentes, los arroyos Los Tapones y Agua Negra (López Pinos, 2003; Riveros Guardia, 2003). La contaminación fecal presente en el agua puede atribuirse tanto a un aporte puntual —como la recepción de los efluentes cloacales aportados por el arroyo Los Tapones, en cuya naciente drena la planta depuradora de Bajo Segura— como a fuentes difusas —originadas en las filtraciones provenientes desde pozos ciegos de las viviendas ubicadas a lo largo del cauce del río.

En base a estos antecedentes, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1) Evaluar la presencia de *E. coli* como especie bioindicadora de contaminación fecal en agua y en peces de la cuenca inferior del Río San Juan; 2) Determinar la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas; 3) Estudiar si el músculo e intestino de peces del género *Astyanax*, capturados en dicha cuenca, actúan como reservorios y/o biomagnificadores de *E. coli* y 4) Indagar si las cepas de *E. coli* aisladas del agua y/o de los tejidos de los peces posee resistencia a distintos antibióticos de uso común en medicina y veterinaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

La subcuenca inferior del río San Juan abarca un área aproximada de 7823 km² y se extiende desde el dique Ignacio de la Roza hasta las lagunas de Guanacache en la Provincia de Mendoza (Lohn, 1978). Esta cuenca irriga la zona más densamente poblada de la provincia, razón por la cual sus aguas se emplean para la agricultura, la industria y el consumo humano (Lloret & Suvires, 2006). En cercanías de la ciudad de San Juan, el río recibe el aporte de agua de los arroyos Agua Negra y Los Tapones (Lloret & Suvires, 2006).

A lo largo del río, se seleccionaron cuatro sitios de muestreo en base al creciente deterioro de sus aguas. El sitio ubicado en la desembocadura del dique Ignacio de la Roza, en la zona denominada Pinar (31° 30' 13,81" S; 68° 38' 33,74" O), se consideró como prístino por el aspecto de sus aguas y sus márgenes. Los sitios ubicados a la altura de los puentes Albardón (31° 27' 29,59" S; 68° 31' 8,71" O) y San Martín (31° 31' 55,6" S; 68° 24' 48,23" O) se escogieron por las condiciones de contaminación difusa proveniente de

asentamientos urbano–marginales y zonas agrícola–ganaderas ubicadas en sus orillas. El cuarto punto, situado a la altura del Puente de Caucete (31° 31' 55,6" S; 68° 24' 48,23" O), se eligió por recibir los efluentes cloacales vertidos por la planta depuradora de Bajo Segura en el arroyo Los Tapones.

MUESTREO

Las muestras de agua y de peces se recolectaron con una periodicidad bimensual desde diciembre de 2006 a octubre de 2007. En cada sitio, se colectaron tres muestras de agua en recipientes estériles a 20 cm de profundidad. Las mismas fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio en frío y mantenidas a 4 °C hasta su procesamiento. También se registró la temperatura del agua al momento de dicha recolección.

Tres ejemplares de peces del género *Astyanax* fueron capturados mediante el uso de redes de mano, trampas tipo mojarrero o cañas de pescar. El arte de pesca se determinó de acuerdo a las características del río en cada uno de los puntos de muestreo. Los peces se trasladaron vivos al laboratorio, dentro de recipientes que contenían el agua del río de la misma zona donde se los recolectó.

Se escogieron peces de este género, denominadas comúnmente «mojarras», debido a su amplia distribución (Menni, 2004) y fácil captura. Además, estudios realizados por Menni *et al.* (1996) señalan que este grupo presenta un amplio rango de tolerancia a diversos factores químicos, condición que permitió encontrarlos en todos los sitios muestreados.

DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* EN AGUA Y EN TEJIDOS DE PECES

El procesamiento de las muestras de agua y de los tejidos para la determinación de la presencia de *E. coli*, se realizó dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.

Los peces se sacrificaron por corte de médula y se extrajeron, en condiciones de asepsia, el intestino y un trozo de músculo dorsal del tronco (aproximadamente 6 cm²). Tanto el intestino como el músculo fueron pesados en balanza de precisión y se homogeneizaron separadamente en solución salina al 0,9%, según lo establecido por El-Shafai *et al.* (2004).

La determinación de la densidad bacteriana se realizó mediante siembra superficial en placa para el recuento directo de colonias. Las muestras de agua obtenidas en Pinar, en Albardón y en San Martín se diluyeron a 1/10 y 1/100. En cambio, en las muestras de Caucete, en las que se esperaba detectar una mayor densidad bacteriana, se emplearon las siguientes diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000. Los homogeneizados de tejido intestinal fueron diluidos según la siguiente relación: para Pinar, Albardón y San Martín: 1/10,

1/100 y 1/1000; y para Cauçete: 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Para los homogeneizados de tejido muscular, se utilizó una única dilución de 1/10, por considerarse que estas muestras deberían poseer menor densidad bacteriana.

De cada muestra de agua u homogeneizado de tejidos se tomaron alícuotas de 0,2 ml, los que se distribuyeron directamente sobre las cajas de Petri con medio agarizado EMB (Britania). Las cajas se incubaron a 44,5 °C durante 48 h, según el protocolo establecido por la American Public Health Association (APHA, 1998). El recuento directo de colonias de *E. coli* se realizó utilizando un estereoscopio a 40 X (APHA, 1998). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro de agua (UFC/ml) o por miligramo de tejido (UFC/mg). Las colonias de *E. coli* fueron individualizadas por poseer un brillo verde metálico al desarrollarse en el medio citado anteriormente. Una vez aisladas las colonias, se las confirmó mediante las siguientes pruebas: IMViC (indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato) y tinción de Gram (APHA, 1998).

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Escherichia coli* AISLADA DE AGUA Y DE PECES

A fin de establecer el grado de sensibilidad a distintos antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas en el agua y en los peces se practicaron antibiogramas por duplicado utilizando la técnica de difusión en placa (Bauer *et al.*, 1996). Dichos antibiogramas se realizaron sobre medio agarizado Mueller Hinton (Britania) a partir de inóculos de 0,5 en la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ células/ml) de densidad bacteriana. Se probaron ocho de los antibióticos más utilizados para esta especie en sus concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), es decir, la concentración mínima de cada antibiótico necesaria para evitar el desarrollo y reproducción bacteriana. Ellos fueron: Ampicilina (10 µg), Amicacina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Ácido nalidíxico (30 µg), Cefalotina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Colistina (10 µg) y Nitrofurantoína (300 µg) (Laboratorios Brizuela). Los halos de inhibición se midieron con calibre. La determinación del grado de resistencia (sensible, intermedio o resistente) de las cepas aisladas, se realizó según las sugerencias del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), exceptuando a Colistina para el que se utilizó los rangos citados por el fabricante (Laboratorio Brizuela, <http://www.brizuela-lab.com.ar/tablan.htm>).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La gran variabilidad observada en los datos referidos a la presencia de *E. coli* en muestras de agua y en tejidos de peces determinó su transformación mediante la fórmula Log_{10} para lograr un mejor ajuste a una función normal. Para dicha transformación, se utilizó la

fórmula $\log(x+1)$, debido a la presencia de valores cero en varias muestras en las que no se detectó la presencia de *E. coli* (Avery *et al.*, 2008). Ante la falta de normalidad y de homogeneidad de varianza de los datos transformados, se procedió a organizar los datos originales en rangos (mediante el programa SPSS 9.0) (Zar, 1999) y a ellos se les practicó un análisis de la varianza a tres vías (criterios de clasificación y niveles de los mismos: *fuentes*: agua, músculo e intestino; *sitios*: Pinar, Albardón, San Martín y Caucete y *meses del año*: diciembre, febrero, abril, junio, agosto y octubre) seguido de la prueba *a posteriori* de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD Fisher) para identificar grupos.

Para analizar las variaciones en el grado de resistencia a antibióticos de *E. coli* aislada en el agua y los peces, también se procedió —por falta de normalidad y de homogeneidad de varianzas— a transformar en rangos los valores del diámetro de los halos de inhibición (Zar, 1999). A continuación se aplicó el análisis de la varianza a tres vías, seguido de la prueba *a posteriori* LSD de Fisher. El procesamiento de los datos se realizó mediante el programa estadístico Infostat (2007).

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* EN AGUA DEL RÍO SAN JUAN

En el agua recolectada en los cuatro sitios se ha detectado la presencia de *E. coli*. Las poblaciones bacterianas de cada sitio muestran patrones de distribución similares a lo largo del periodo analizado (Figura 1A). Sin embargo, los valores de la densidad de la población bacteriana de cada uno de ellos se diferencian significativamente ($p < 0,001$) (Figura 1A).

En el Pinar, considerado como sitio prístino, se determinó la presencia de *E. coli* en el agua recolectada durante abril y junio. En Albardón y San Martín se aisló a *E. coli* en todos los meses analizados, con excepción de agosto. Las densidades de *E. coli* en las muestras de ambos sitios no se diferenciaron estadísticamente entre sí. No obstante, las densidades bacterianas detectadas en diciembre, junio y octubre resultaron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de la zona del Pinar. En Caucete se obtuvieron las muestras de agua que presentaron la mayor densidad bacteriana de los cuatro sitios analizados ($p < 0,05$). En este punto, la densidad de *E. coli* resultó significativamente más elevada en diciembre, abril y agosto respecto al de los otros tres sitios ($p < 0,05$).

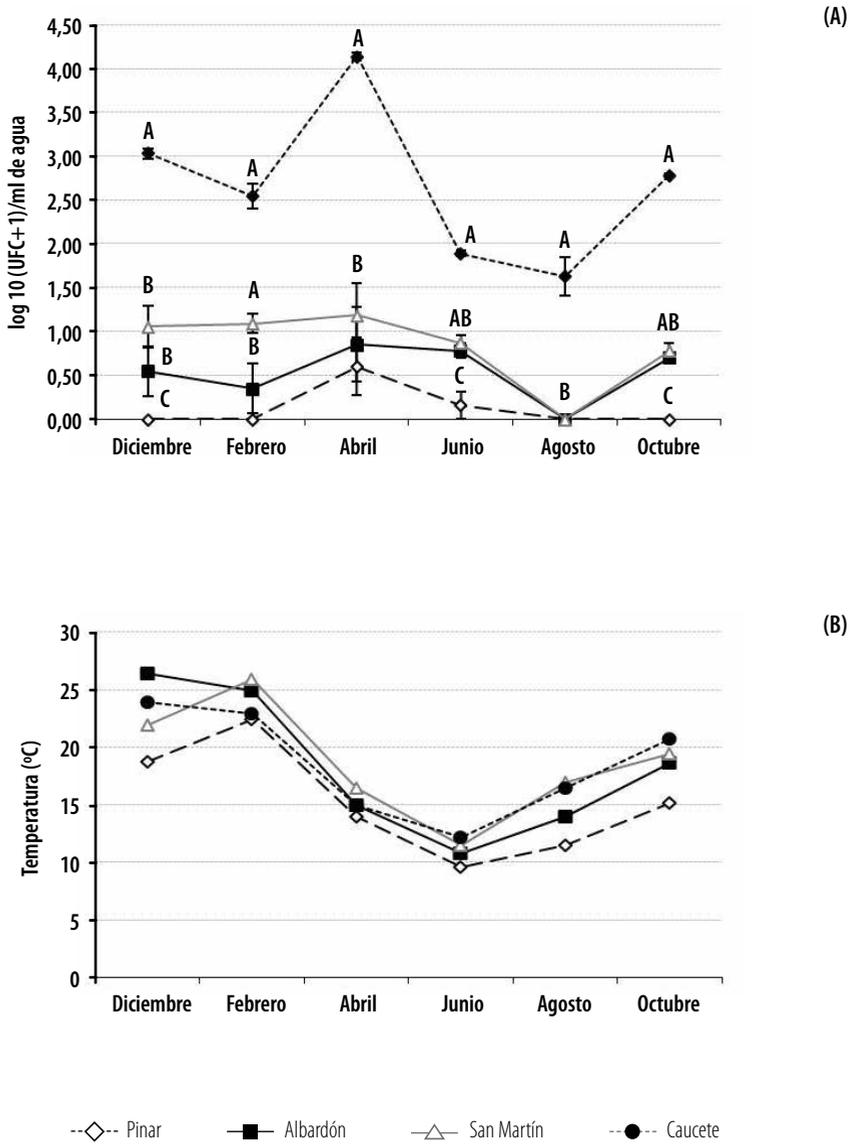


Figura 1. (A) Variación anual en la densidad de *Escherichia coli* aislada de agua ($n = 3$) en Pinar, San Martín, Albardón y Cauce, desde diciembre de 2006 a octubre de 2007. Cada valor representa la media \pm error estándar de la variable transformada; letras distintas indican diferencias significativas entre sitios, para cada mes. (B) Variación anual de la temperatura del agua registrada en cada sitio al momento del muestreo.

DETECCIÓN DE *Escherichia coli* EN MÚSCULO E INTESTINO DE *Astyanax*

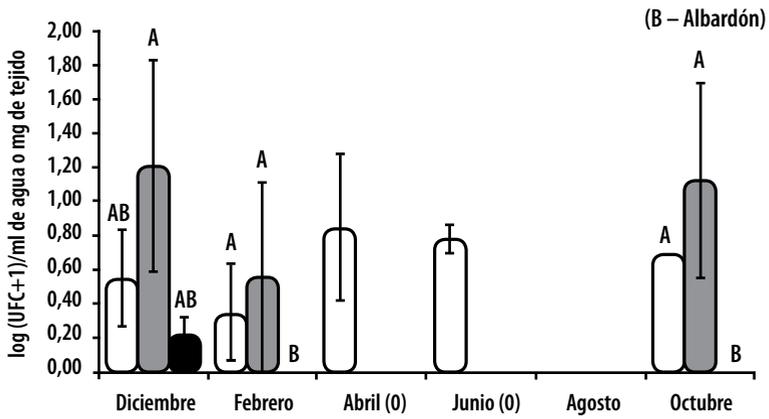
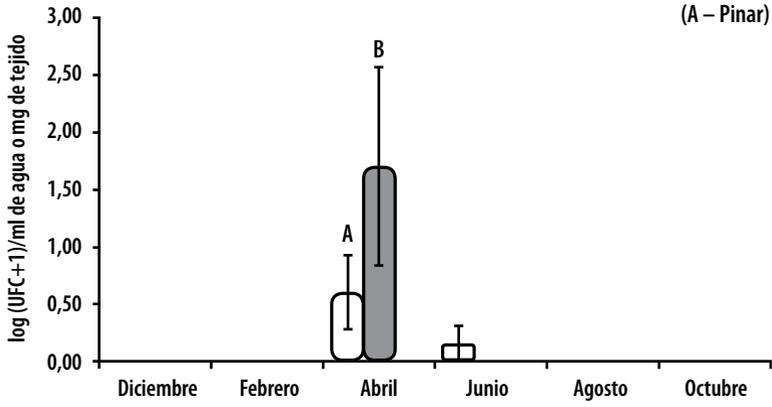
Dada la gran variabilidad anual observada en el caudal del río San Juan y en la temperatura de sus aguas (aproximadamente unos 15 °C de amplitud térmica) (Figura 1B), no fue posible capturar peces en todos los sitios durante abril, junio y agosto. Así, en abril se obtuvieron ejemplares sólo en Pinar; en junio en San Martín y en agosto en Pinar, San Martín y Albardón. Este hecho resultó un serio inconveniente para obtener patrones anuales de distribución bacteriana en los tejidos de los peces, limitando las posibilidades de análisis del grado de infección en ellos.

En la zona del Pinar se detectó la presencia de *E. coli* sólo en el intestino de los peces capturados en abril, no registrándose invasión del tejido muscular. En dicho mes, la densidad bacteriana en el intestino fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la del agua (Figura 2A).

En Albardón, se identificaron cepas de *E. coli* en los intestinos de peces capturados durante los meses en los que se registraron las temperaturas del agua más elevadas: diciembre, febrero y octubre. En el caso particular del mes de diciembre, la densidad bacteriana del contenido intestinal fue lo suficientemente elevada como para infectar el músculo (Figura 2B).

En San Martín se detectó a *E. coli* en intestino de peces capturados en los meses de diciembre y junio, produciéndose invasión del tejido muscular de los peces recolectados en diciembre. En el resto de los meses en los que se capturaron peces no se aislaron colonias de *E. coli* (Figura 2C).

El patrón de distribución de las cepas de bacterias aisladas en intestino y músculo de los peces capturados en Caucete fue similar al de Albardón (Figura 2D).



□ Agua ■ Intestino ■ Músculo

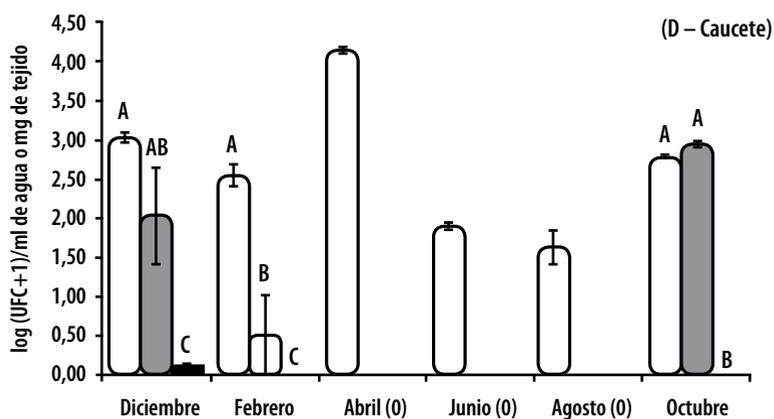
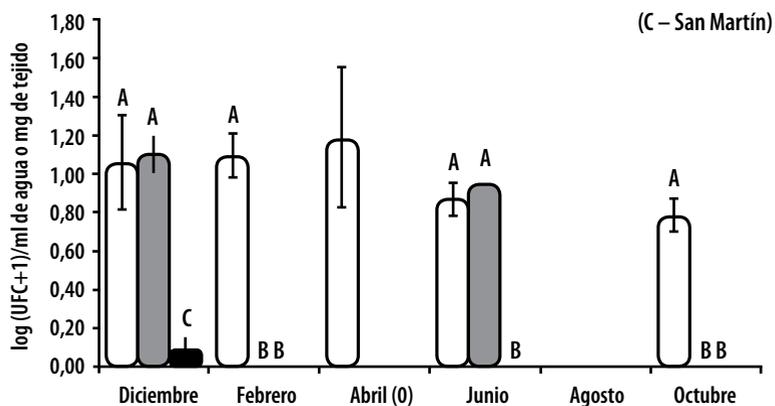


Figura 2. Variación temporal en la densidad de *Escherichia coli* aisladas en muestras de agua, de intestino y músculo de peces del género *Astyanax* (n=3) recolectados en (A) Pinar, (B) Albardón, (C) San Martín y (D) Cauce. Cada valor representa la media ± error estándar de la variable transformada; letras distintas indican diferencias significativas entre las densidades bacterianas en agua y tejidos, para cada mes, dentro de cada sitio. Los números cero entre paréntesis indican los meses en que no se capturaron peces.

AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS EN AGUA Y TEJIDO MUSCULAR E INTESTINO DE PECES

Los resultados obtenidos demostraron que la gran mayoría de las colonias de *E. coli* aisladas en las muestras de agua y de los tejidos de los peces de cada sitio, experimentaron distinto grado de resistencia a los antibióticos ensayados (Figuras 3A, 3B, 3C). Cabe destacar que, para la interpretación de los resultados, se consideraron a las colonias con resistencia intermedia y completa como un único grupo, al que se denominó «resistente» a un determinado antibiótico (Reinthal *et al.*, 2003). En la zona del Pinar se analizaron sólo las respuestas a antibióticos en las bacterias aisladas del agua, ya que las aisladas de intestino no proliferaron en el medio de enriquecimiento.

Como puede observarse en la Tabla 1, las bacterias aisladas del agua recolectada en cada zona expresan resistencia a algunos de los antibióticos ensayados. En todos los sitios se observa que la resistencia a ampicilina > colistina > amicacina/ cefalotina > nitrofurantoina/ácido nalidixico > gentamicina/cloranfenicol.

El número de colonias resistentes a los distintos antibióticos aisladas del agua como de los tejidos se incrementó significativamente ($p < 0,05$) en Caucete respecto a San Martín y Albardón (Figuras 3A, 3B, 3C).

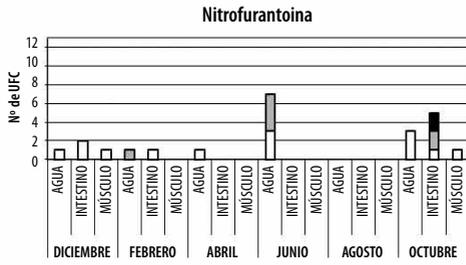
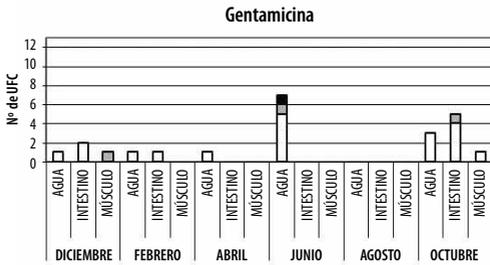
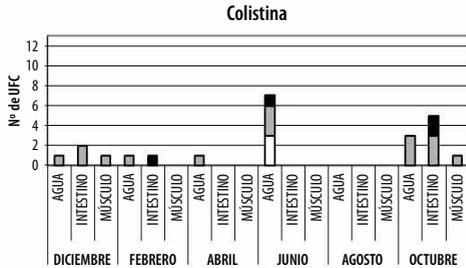
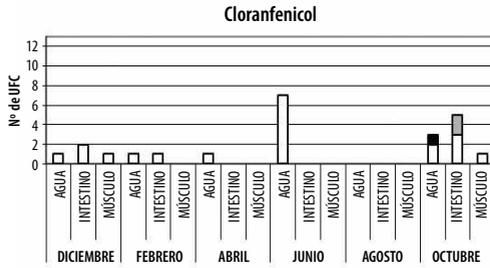
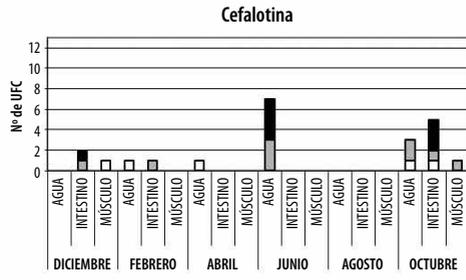
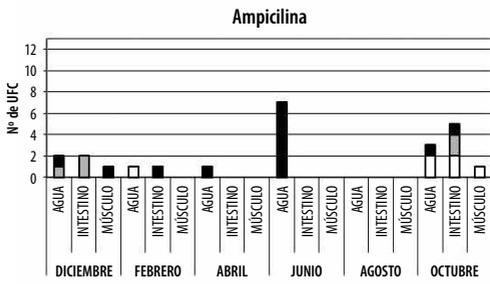
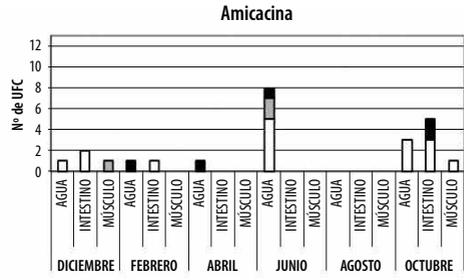
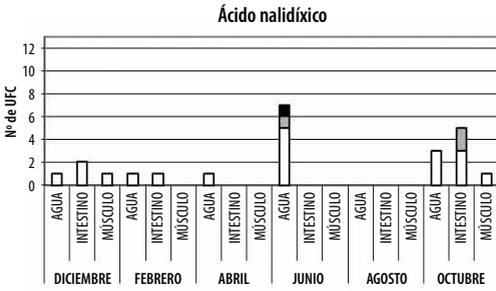
A continuación se analizarán las respuestas de las cepas aisladas cuyo grado de resistencia fue superior al 50 % en las muestras de agua.

Con respecto a la resistencia de *E. coli* en el agua y los tejidos de los peces a ampicilina y amicacina se detectó una interacción significativa ($p = 0,0045$ para ampicilina, $p = 0,0011$ para amicacina) entre los distintos meses y los sitios de muestreo analizados. Así, el grado de resistencia a ampicilina expresado por las colonias de *E. coli* detectadas en el agua durante junio, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las muestras de Albardón respecto a las de Caucete. En este último sitio, aparecieron bacterias resistentes en músculo e intestino. En abril, la totalidad de las bacterias en el agua de los cuatro sitios resultaron resistentes a dicho antibiótico. En octubre, predominaron las colonias bacterianas resistentes en el agua y en los tejidos de los peces capturados en Albardón y Caucete. Por último, en febrero se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el grado de resistencia a ampicilina en el agua y los peces de Albardón, San Martín y Caucete, comparándolas con los mismos sitios en el mes de abril.

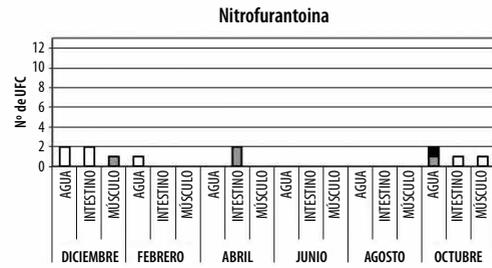
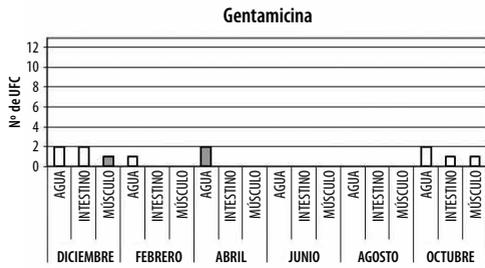
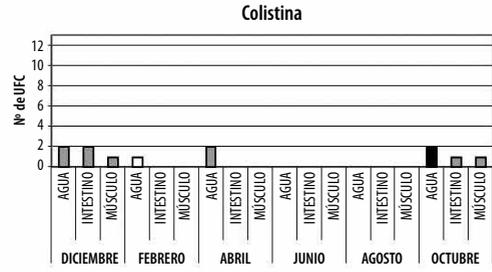
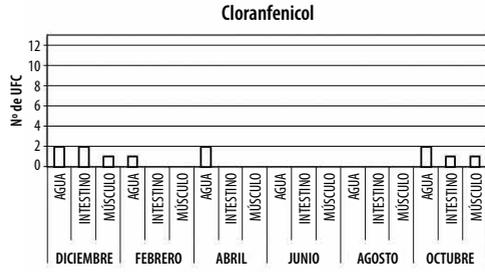
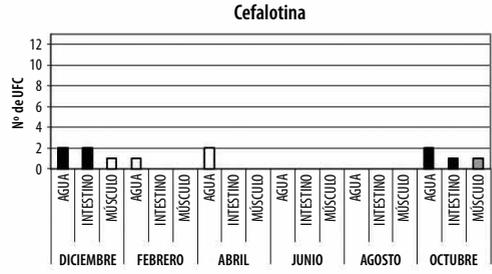
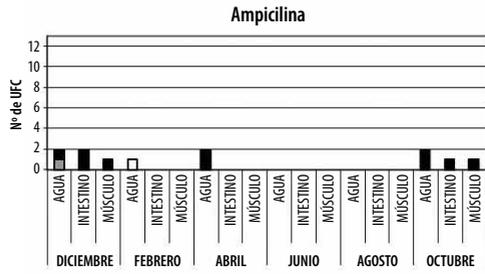
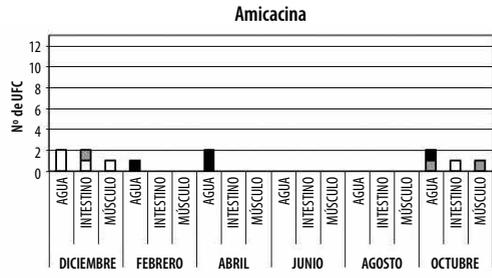
El grado de resistencia a amicacina expresado por *E. coli* aislada del agua de Pinar, Albardón y San Martín aumentó significativamente ($p < 0,05$) en abril con respecto a Caucete.

En relación a colistina se determinó que las cepas provenientes de los intestinos de peces capturados en Albardón y San Martín evidenciaban una resistencia significativamente mayor ($p < 0,05$) que aisladas de los peces de Caucete. En contraposición, en las muestras de músculo de peces capturados de Caucete, *E. coli* expresó mayor resistencia ($p < 0,05$) a este antibiótico que las de Albardón y San Martín.

(A)



□ Sensible ■ Intermedia ■ Resistente



□ Sensible ■ Intermedia ■ Resistente

(C)

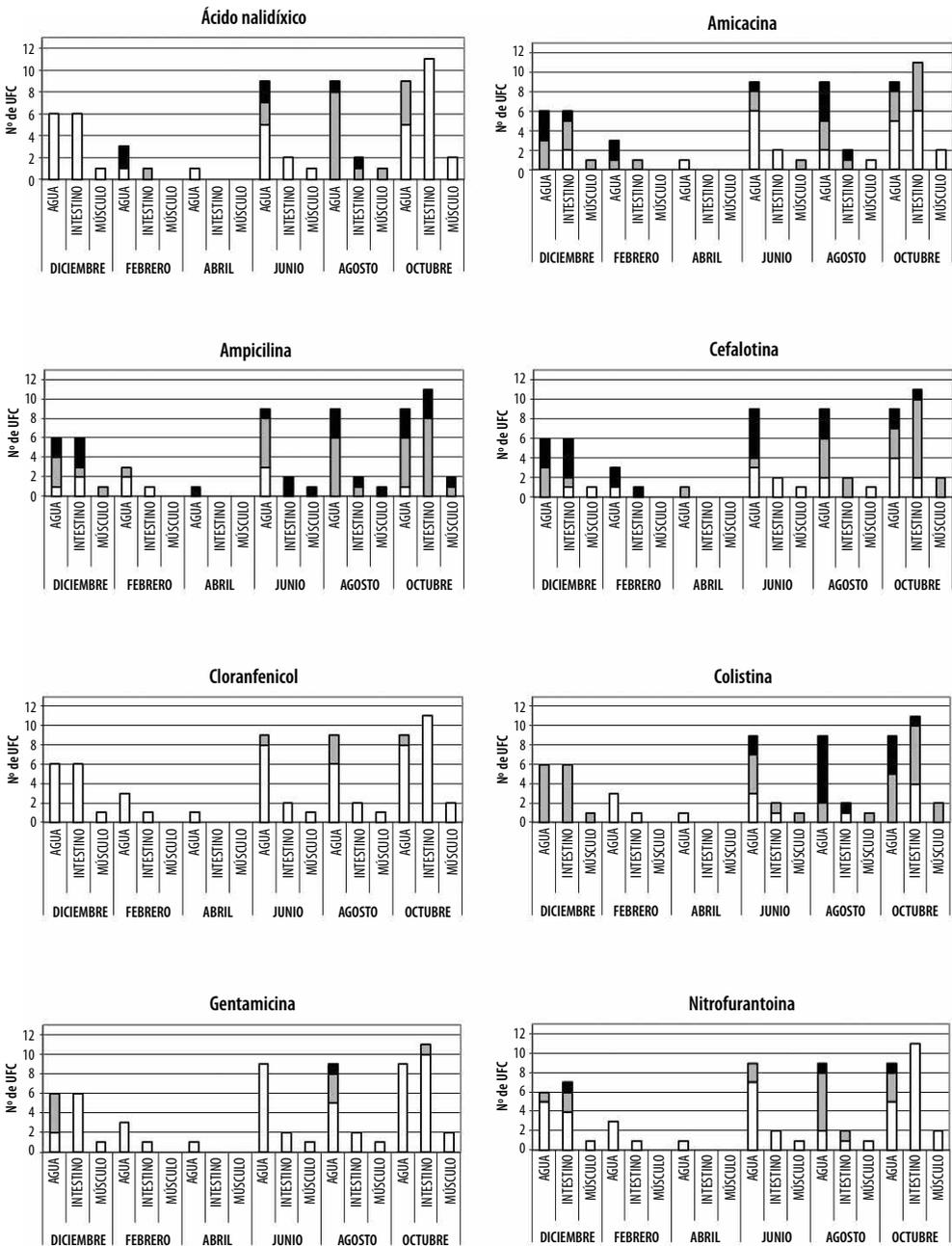


Figura 3. Número de colonias de *Escherichia coli* aisladas de muestras de agua y de intestino y de músculo de peces del género *Astyanax* recolectados en Albardón (A), San Martín (B) y Cauce (C), clasificadas según su respuesta a distintos antibióticos usados en medicina y veterinaria.

Sitio	Antibiótico	Porcentaje de UFC resistente a antibióticos		
		Agua	Intestino	Músculo
Pinar	Ácido Nalidíxico	0		
	Amicacina	33,33		
	Ampicilina	100		
	Cefalotina	0		
	Cloranfenicol	0		
	Colistina	33,33		
	Gentamicina	0		
	Nitrofurantoina	0		
San Martín	Ácido Nalidíxico	14,29	33,33	0
	Amicacina	71,43	100,00	50
	Ampicilina	85,71	100,00	100
	Cefalotina	57,14	100,00	50
	Cloranfenicol	0,00	0,00	0
	Colistina	85,71	100,00	50
	Gentamicina	28,57	0,00	50
	Nitrofurantoina	57,14	0,00	50
Albardón	Ácido Nalidíxico	15,38	25,00	0
	Amicacina	38,46	25,00	50
	Ampicilina	84,62	75,00	50
	Cefalotina	69,23	87,50	50
	Cloranfenicol	7,69	25,00	0
	Colistina	76,92	100,00	100
	Gentamicina	15,38	12,50	50
	Nitrofurantoina	38,46	50,00	0
Caucete	Ácido Nalidíxico	51,35	13,64	20
	Amicacina	62,16	54,55	40
	Ampicilina	81,08	86,36	100
	Cefalotina	75,68	77,27	40
	Cloranfenicol	13,51	0,00	0
	Colistina	75,68	68,18	100
	Gentamicina	21,62	4,55	0
	Nitrofurantoina	37,84	18,18	0

Tabla 1. Porcentaje de UFC resistentes a antibióticos aisladas en el agua y en los tejidos de peces recolectados en los cuatro sitios del río San Juan.

En la mayoría de las muestras de agua y de tejidos de peces de Albardón, San Martín y Caucete se detectó la presencia de bacterias resistentes a cefalotina. Dicha resistencia se observó en el agua de los tres sitios exceptuando la recolectada en febrero y abril en Albardón y San Martín. Las bacterias aisladas de los intestinos de los peces de los tres sitios mostraron un grado de resistencia significativamente mayor ($p < 0,05$) que las del tejido muscular.

En el agua y los tejidos de los peces obtenidos de Caucete durante agosto se aislaron colonias resistentes al ácido nalidíxico.

Finalmente, la resistencia de las colonias bacterianas al antibiótico nitrofurantoina evidenció un marcado incremento ($p < 0,05$) durante el mes de abril en relación al mes de febrero. Por otra parte, en el mes de febrero, se detectó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la resistencia a dicho antibiótico en las cepas aisladas del agua y de los tejidos de los peces capturados en Albardón y San Martín, respecto a los de Caucete.

DISCUSIÓN

El grave deterioro de la calidad bacteriológica del agua en el río San Juan responde a los diversos tipos de fuentes de contaminación que afectan la subcuenca inferior y coincide con los hallazgos de otros autores en distintos ambientes acuáticos (Kloot, 2007; Touron *et al.*, 2007; McGechan *et al.*, 2008; Schippmann *et al.*, 2013).

En la zona del Pinar, considerada como sitio prístino, se detectó la presencia de *E. coli* en el agua durante abril y junio, aunque las densidades bacterianas fueron significativamente menores que las de los otros sitios. Los cursos de agua que corren por zonas deshabitadas son usualmente considerados como sitios libres de contaminación bacteriana (Mc Donald *et al.*, 2008). Sin embargo, en ambientes naturales despoblados se han encontrado bacterias coliformes, atribuyendo su presencia a animales o a actividades turísticas (Pathak & Gopal, 2007; McDonald *et al.*, 2008). La detección de la mayor densidad de *E. coli* en agua durante el mes de abril podría reflejar la presencia de reservorios bacterianos en los sedimentos del cauce del río (Berthe *et al.*, 2008; Garzio–Hadzick *et al.*, 2010; Thevenon *et al.*, 2012) respondiendo a los bajos niveles de caudal registrados en ese mes. Por otro lado, la densidad poblacional de *E. coli* detectada en este sitio (1200 UFC/100ml) sobrepasa el límite de 126 UFC/100ml propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y United States Environmental Protection Agency (US–EPA) para el uso seguro del agua con fines recreativos (Kim *et al.*, 2005; García–Armissen & Servais, 2007; Ham *et al.*, 2012). Además, el Dique Ignacio de la Roza provee de agua a zonas cultivadas, por lo que debe destacarse que dicho valor supera al límite fijado (1000 UFC/100ml) por la OMS para el riego de vegetales de consumo crudo (Palese *et al.*, 2009).

Las densidades bacterianas detectadas en agua de Albardón y de San Martín resultaron significativamente mayores que las de la zona del Pinar, aunque no se detectó presencia de *E. coli* durante el mes de agosto. La existencia de algunas viviendas y establecimientos agrícolas–ganaderos en las márgenes de ambos sitios sugeriría la influencia de fuentes de contaminación difusa, tales como filtraciones desde pozos sépticos o infiltración de aguas de riego (Al Bakri *et al.*, 2008; Trevisan *et al.*, 2010).

Las densidades bacterianas detectadas en Cauce te superan ampliamente los estándares recomendados, por todas las organizaciones internacionales, para el agua de consumo (0 UFC/ml) (Rompré *et al.*, 2002) y de riego (1000 UFC/ml) (Palese *et al.*, 2009). Esta zona recibe los efluentes cloacales que libera la planta depuradora de Bajo Segura en su afluente, el arroyo Los Taponés, donde se ha detectado la presencia de bacterias coliformes (López Pinos, 2003). Esto representa una fuente de contaminación puntual severa para el río San Juan, lo que explicaría el significativo incremento en la densidad de *E. coli* detectada en esta zona respecto a los otros tres sitios analizados.

Sumada a la variación en la distribución espacial de *E. coli* en el agua del río, se pudo establecer un patrón de variación temporal en la detección de éstas bacterias a lo largo del año analizado. En abril se observó la mayor densidad de bacterias en el agua obtenida en los cuatro sitios analizados. En este mes, la temperatura del agua medida en cada uno de los sitios osciló alrededor de los 15 °C, favoreciendo la permanencia de esta bacteria en el agua (Pathak & Gopal, 2007; Suhaimi *et al.*, 2008; Garzio–Hadzick *et al.*, 2010).

La presencia de *E. coli* se ha detectado en tejido muscular e intestino de peces del género *Astyanax* capturados en los distintos sitios de muestreo. Las densidades bacterianas encontradas en intestino no se diferenciaron significativamente de las detectadas en agua, pero resultaron significativamente mayores con respecto a las determinadas en músculo. Estos resultados coinciden con hallazgos realizados en distintas especies de peces (Fatal *et al.*, 1992; El–Shafai *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2004) y difieren con otros (ej. Dang & Dalsgaard, 2012). De acuerdo con estos estudios, el límite de densidad bacteriana en agua que permite la colonización en músculo es variable ya que el grado de invasión que pueden sufrir los peces es característico de cada especie y depende del estado inmunológico de cada individuo.

La OMS recomienda que la concentración de bacterias coliformes fecales en agua destinada a la piscicultura debe estar por debajo de 10³ células/100ml (El–Shafai *et al.*, 2004). Considerando que *E. coli* es el miembro más representativo y abundante de este grupo, los resultados obtenidos en este estudio (>1600 UFC/100ml), mostrarían densidades poblacionales mayores a dicho límite en todas las muestras de agua proveniente de Cauce te a lo largo del año. Incluso, durante abril, se observaron niveles de *E. coli* que superaron las 1200 UFC/100ml en muestras de agua de Pinar, Albardón y San Martín. Las elevadas densidades bacterianas en las aguas del río San Juan comprometerían seriamente el

estado sanitario de los peces, propiciando la infección de sus tejidos. *E. coli* se detectó en el músculo de *Astyanax sp.* cuando la densidad bacteriana en agua superó las 8 UFC/ml.

La presencia de *E. coli* en los tejidos de los peces experimentó un patrón de aparición temporal. Así, en Albardón y en Cauce, se aislaron bacterias en los intestinos de peces capturados durante diciembre, febrero y octubre, en coincidencia con los registros de las temperaturas más elevadas del agua. En diciembre la densidad bacteriana del contenido intestinal fue lo suficientemente elevada como para infectar el músculo de los peces capturados en Albardón, San Martín y Cauce. Por otra parte, en algunos meses se observó que la densidad de las poblaciones bacterianas del intestino superó la del agua. Los peces, al ser animales ectotérmicos, experimentan durante períodos de elevada temperatura, una mayor actividad metabólica, favoreciendo su desplazamiento y alimentación. De este modo, una vez que la bacteria ingresa a tubo digestivo, encuentra en su interior un alto contenido de nutrientes que favorece su permanencia y reproducción (Fattal *et al.*, 1992; Guzmán *et al.*, 2004). En contraposición, las bajas temperaturas del agua disminuyen su actividad razón por la cual resultó difícil capturarlos en los meses más fríos. Además, la baja densidad bacteriana encontrada en el intestino de los peces indicaría una condición desfavorable para las bacterias (Paperno & Brodie, 2004; Suhaimi *et al.*, 2008). Por ello, en los meses de invierno, sólo se detectó *E. coli* en el agua y no en los tejidos de los peces capturados en Albardón y Cauce.

En este trabajo también se estableció que la mayoría de las colonias de *E. coli* aisladas del agua y de los tejidos de los peces capturados en los distintos sitios, expresaron resistencia a diversos antibióticos de uso común en medicina y en veterinaria. Si bien el número de bacterias detectadas en los distintos sitios es bajo, su corto ciclo celular (entre 20 y 30 minutos según la especie) aumenta su capacidad de adaptarse genéticamente a cambios ambientales a través de mutaciones, lo que determinaría su rápida selección en la población (Vignesh *et al.*, 2012). La aparición de bacterias resistentes a antibióticos en ambientes acuáticos como producto del impacto antrópico, ha sido ampliamente documentada por diversos autores (García-Armisen & Servais, 2007; Baquero *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009; Thevenon *et al.* 2012).

La resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas del agua y de los tejidos de los peces varió según la época del año en que se recolectaba la muestra y/o el sitio analizado. Así, en el agua de la zona del Pinar, se encontró un número poco significativo de bacterias resistentes a los distintos antibióticos ensayados. Este hecho podría atribuirse a la lejanía de los centros urbanos o de establecimientos ganaderos que viertan antibióticos en sus efluentes y la consecuente carencia de una presión selectiva que favorezca la proliferación de bacterias resistentes a ellos (Miranda & Zemelman, 2001; Costanzo, 2005; Kümmerer, 2009). En cambio, *E. coli* aislada del agua de la zona de Cauce mostró resistencia frente a los ocho antibióticos analizados. Este hallazgo se relacionaría con la

recepción de los efluentes cloacales de gran parte de la población de la capital sanjuanina, creando así una fuerte presión hacia la selección de cepas bacterianas resistentes.

Las bacterias aisladas de los tejidos de peces también expresaron grados de resistencia variables según el tipo de antibiótico ensayado. Coincidiendo con lo observado en el agua, las bacterias aisladas de Caucete expresaron el mayor porcentaje de resistencia. De todas maneras, la proporción de bacterias resistentes aisladas de tejidos resultó menor que las aisladas de agua lo que se debería a una posible selección en el sistema gastrointestinal de los peces que no permitiría el desarrollo de bacterias resistentes (Miranda & Zemelman, 2001).

Por otra parte, en los meses de otoño e invierno, se detectaron bajas proporciones de bacterias resistentes a los distintos antibióticos. Esta proporción se incrementó en los meses de octubre y de diciembre, en especial en la zona de Caucete. Este hallazgo deja abierta la posibilidad de investigar si el incremento en la aparición de la resistencia, sería un efecto desencadenado por la administración masiva de antibióticos a la población en épocas invernales donde las afecciones son más frecuentes. Esta administración masiva incrementaría la liberación de antibióticos y de bacterias resistentes a ellos hacia los medios acuáticos. Como consecuencia de ello, tanto los antibióticos como bacterias resistentes a ellos, pueden ser ingeridos directamente del agua o a través de alimentos infectados por riego, provocando en la población la dispersión de genes de resistencia que vuelve inocuos los tratamientos antimicrobianos comúnmente utilizados (Kumar *et al.*, 2005; Kümmerer, 2009).

La resistencia múltiple es una capacidad adquirida por *E. coli* a través de diferentes vías (Oliver *et al.*, 2005; Watkinson *et al.*, 2007; Lindsey *et al.*, 2011). Las bacterias aisladas del agua del río San Juan presentaron un alto porcentaje de resistencia múltiple a los antibióticos ensayados. La mayoría de las bacterias aisladas de agua y de los tejidos de los peces capturados en los distintos sitios, resultaron sensibles a cloranfenicol. Estos resultados coinciden con los hallados por Kumar *et al.* (2005) y Coleman *et al.* (2013) y se explicarían debido a que, por su toxicidad, no se recomienda el uso de este antibiótico con fines terapéuticos (Wiest *et al.*, 2012). Con respecto al ácido nalidixico, las colonias bacterianas resultaron sensibles a él en las muestras de agua y los tejidos de los peces obtenidos del Pinar, San Martín y Albardón. En cambio, en las cepas aisladas de Caucete, se expresan genes de resistencia. Estos resultados concuerdan con los de Reinthaler *et al.* (2003) y Maal-Bared *et al.* (2013). Por el contrario, la ampicilina fue el antibiótico frente al cual se detectó el mayor grado de resistencia en casi todas las muestras de agua y de tejidos analizadas. Este hallazgo coincide con la mayoría de los estudios publicados (Kronvall *et al.*, 2005; Gregova *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013); en los que se enfatiza la relación existente entre la aparición de resistencia a la ampicilina y las fuentes de contaminación puntual de origen humano. Finalmente, se destaca el hecho

de que las cepas de *E. coli* aisladas de tejido de peces capturados en Albardón, San Martín y Cauce, presentaron alto porcentaje de resistencia frente al antibiótico colistina. Este antibiótico es utilizado ampliamente en veterinaria para el control de infecciones causadas por *E. coli*, sobre todo en cerdos y aves de corral (Kempf *et al.*, 2013). Los porcentajes de resistencia encontrados en el agua y en los tejidos de los peces superan los informados, por otros autores, para animales de granja (cerdos) (Harada *et al.*, 2005; Enne *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Sobre la base de estos resultados podemos concluir que a lo largo de la subcuenca inferior del Río San Juan existiría un incremento en la densidad poblacional de cepas de *E. coli* tanto en agua como en intestino y músculos de peces del género *Astyanax*, desde la zona del Pinar hasta la de Cauce. Además se pudo comprobar que la mayoría de estas cepas expresan resistencia a antibióticos utilizados en medicina y veterinaria, razón por la cual es necesario considerar que las bacterias resistentes a antibióticos constituyen un bioindicador de importancia sanitaria y ecológica, el cuál debería ser considerado a la hora de establecer criterios de calidad de un recurso hídrico.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Juan por subsidiar este proyecto de investigación. Al Instituto Nacional del Agua, Centro Regional de Aguas Subterráneas (INA-CRAS) y a la División Irrigación, del Departamento de Hidráulica de San Juan por los datos complementarios aportados.

A la Dra. Adriana Abril (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba) por la orientación metodológica. A Ariel Azcuy por la colaboración con el trabajo de campo.

Recibido | Received: 13 de mayo de 2013

Aceptado | Accepted: 22 de octubre de 2013

REFERENCIAS

- Al Bakri, D., S. Rahman & L. Bowling.** 2008. Sources and management of urban stormwater pollution in rural catchments, Australia. *J. Hydrol.* 356 (3–4): 299–311.
- American Public Health Association (APHA).** 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th Edition. Washington, DC. APHA.
- Avery, L. M., A. P. Williams, K. Killham & D. L. Jones.** 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal–drinking troughs. *Sci. Total Environ.* 389: 378–385.
- Baquero, F., J. L. Martínez & R. Cantón.** 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19 (3): 260–265.
- Bauer, A., W. Kirby, J. Skerris & M. Turck.** 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diffusion method. *Am. J. Pathol.* 45: 494–496.
- Berthe, T., A. Touron, J. Leloup, J. Deloffre, & F. Petit.** 2008. Faecal–indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). *Mar. Pollut. Bull.* 57: 59–67.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Supplemental Table 2A, Enterobacteriaceae M02 and M07.
- Coleman, B. L., M. Louie, M. I. Salvadori, S. A. McEwen, N. Neumann, K. Sibley, R. J. Irwini, F. B. Jamieson, D. Daignault, A. Majury, S. Braithwaite, B. Crago & A. J. McGeer.** 2013. Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water Res.* 47 (9): 3026–3036.
- Costanzo, S. D., J. Murby & J. Bates.** 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.* 51: 218–223.
- Daly, E., P. Kolotelo, C. Schang, C. A. Osborne, R. Coleman, A. Deletic & D. T. McCarthy.** 2013. *Escherichia coli* concentrations and loads in an urbanized catchment: The Yarra River, Australia. *J. Hydrol.* 497: 51–61.
- Dang, S. T. & A. Dalsgaard.** 2012. *Escherichia coli* contamination of fish raised in integrated pig–fish aquaculture systems in Vietnam. *J. Food Prot.* 75 (7): 1317–1319.
- El-Shafai, S., H. Gijzen, F. Nasr & F. El-Gohary.** 2004. Microbial quality of tilapia reared in fecal–contaminated ponds. *Environ. Res.* 95: 231–238.
- Enne, V. I., C. Cassar, K. Spriggins, M. J. Woodward & P. M. Bennett.** 2008. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol. Lett.* 278: 193–199.
- Enriquez, C., N. Nwachuku & C. P. Gerba.** 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. *Rev. Environ. Health.* 16 (2): 117–131.
- Fattal, B., A. Dotan & Y. Tchorsh.** 1992. Rates of experimental microbiological contamination of fish exposed to polluted water. *Water Res.* 26: 1621–1627.
- Garcia–Armisen, T. & P. Servais.** 2007. Respective contributions of point and non–point sources of *E. coli* and enterococci in a large urbanized watershed (the Seine River, France). *J. Environ. Manage.* 82: 512–518.
- Garzio–Hadzick, A., D. R. Shelton, R. L. Hill, Y. A. Pachepsky, A. K. Guber & R. Rowland.** 2010. Survival of manure–borne *E. coli* in streambed sediment: Effects of temperature and sediment properties. *Water Res.* 44 (9): 2753–2762.
- Gharibi, H., M. H. Sowlat, A. H. Mahvia, H. Mahmoudzadeh, H. Arabalibeik, M. Keshavarz, N. Karimzadeh & G. Hassani.** 2012. Development of a dairy cattle drinking water quality index (DCWQI) based on fuzzy inference systems. *Ecol. Ind.* 20: 228–237.
- Gregova, G., M. Kmetova, V. Kmet, J. Venglovsky & A. Feher.** 2012. Antibiotic resistance of *Escherichia*

- coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Ann. Agric. Environ. Med.* 19 (1): 75–77.
- Guzmán, M., M. Bistoni, L. Tamagnini & R. Gonzalez.** 2004. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Res.* 38: 2368–2374.
- Ham, Y.-S., H. Kobori, J.-H. Kang, T. Matsuzaki, M. Lino & H. Nomura.** 2012. Distribution of antibiotic resistance in urban watershed in Japan. *Environ. Pollut.* 162: 98–103.
- Harada, K., T. Asay, A. Kojima, C. Oda, K. Ishijara & T. Takahashi.** 2005. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67(10): 999–1003.
- Infostat.** 2007. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Kay, D., J. Crowther, C. M. Stapleton, M. D. Wyer, L. Fewtrell, A. Edwards, C. A. Francis, A. T. McDonald, J. Watkins & J. Wilkinson.** 2008. Faecal indicator organism concentrations in sewage and treated effluents. *Water Res.* 42, 442–454.
- Kemper, N.** 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Ind.* 8: 1–13.
- Kempf I., M. A. Fleury, D. Drider, M. Bruneau, P. Sanders, C. Chauvin, J.-Y. Madec & E. Jouy.** 2013. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int. J. Antimicrob. Agents* 42 (5): 379–383.
- Kim, G., E. Choi & D. Lee.** 2005. Diffuse and point pollution impacts on the pathogen indicator organism level in the Geum River, Korea. *Sci. Total Environ.* 350: 94–105.
- Kloot, R. W.** 2007. Locating *Escherichia coli* contamination in a rural South Carolina watershed. *J. Environ. Manage.* 83: 402–408.
- Kronvall, G., M. Larsson, C. Borén, G. Kahlmeter, A. Bartoloni, G. M. Rossolini, M. Grape, G. Kristiansson & I. Karlsson.** 2005. Extended antimicrobial resistance screening of the dominant faecal *Escherichia coli* and of rare resistant clones. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26: 473–478.
- Kumar, S., A. Parvathi & I. Karunasagar.** 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *J. Microbiol. & Biotech.* 21: 619–623.
- Kumar, S., V. R. Tripathi & S. K. Garg.** 2012. Physico-chemical and microbiological assessment of recreational and drinking waters. *Environ. Monit. Assess.* 184: 2691–2698.
- Kümmerer, K.** 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere* 75 (4): 435–441.
- Lindsey R. L., J. G. Frye, S. N. Thitaram, R. J. Meinersmann, P. J. Fedorka-Cray & M. D. Englen.** 2011. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* by antimicrobial resistance profiles, plasmid replicon typing, and pulsed-field gel electrophoresis. *Microb. Drug Resist.* 17 (2): 157–163.
- Lloret, G. & G. M. Suvires.** 2006. Groundwater basin of the Tulum Valley, San Juan, Argentina: A morpho-hydrogeologic analysis of its central sector. *J. S. A. Earth Sci.* 21 (3): 267–275.
- Lohn, P.** 1978. Estudio hidroquímico de la cuenca hidrográfica del Río San Juan. Informe INA-CRAS.
- López Pinos, S.** 2003. Análisis del sistema agua en el Arroyo Los Tapones, San Juan, Argentina. Trabajo Final de Licenciatura. Carrera de Biología – Orientación Ecología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de San Juan. 51 pp.
- Li, J., R. L. Nation, R. W. Milne, J. D. Turnidge & K. Coulthard.** 2010. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25: 11–25.
- Maal-Bared, R., K. H. Bartlett, W. R. Bowie & E.**

- R. Hall.** 2013. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Sci. Total Environ.* 443: 315–323.
- Martinez, J. L.** 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157 (11): 2893–2902.
- McDonald, A. T., P. J. Chapman & K. Fukasawa.** 2008. The microbial status of natural waters in a protected wilderness area. *J. Environ. Manage.* 87: 600–608.
- McGechan, M. B., D. R. Lewis & A. J. A. Vinten.** 2008. A river water pollution model for assessment of best management practices for livestock farming. *Biosyst. Eng.* 99 (2): 292–303.
- Menni, R. C., S. E. Gómez & F. López Armengol.** 1996. Subtle relationships: freshwater fishes and water chemistry in southern South America. *Hydrobiologia.* 328: 173–197.
- Menni, R. C.** 2004. El Oeste de la Argentina Central. En: Peces y ambientes en la Argentina continental. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales. Nº 5. Buenos Aires. 316 pp.
- Miranda, C. & R. Zemelman.** 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (11): 1096–1102.
- Oliver, D. M., L. Heathwaite, P. M. Haygarth & C. D. Clegg.** 2005. Transfer of *Escherichia coli* to water from drained and undrained grassland after grazing. *J. Environ. Qual.* 34: 918–925.
- Pachepsky, Y., D. R. Shelton, J. E. T. McLain, J. Patel & R. E. Mandrell.** 2011. Chapter Two – Irrigation Waters as a Source of Pathogenic Microorganisms in Produce: A Review. *Adv. Agron.* 113, 75–141.
- Palese, A. M., V. Pasquale, G. Celano, G. Figliuolo, S. Masi & C. Xiloyannis.** 2009. Irrigation of olive groves in Southern Italy with treated municipal wastewater: Effects on microbiological quality of soil and fruits. *Agric. Ecosyst. Environ.* 129: 43–51.
- Paperno, R. & R. B. Brodie.** 2004. Effects of environmental variables upon the spatial and temporal structure of a fish community in a small, freshwater tributary of the Indian River Lagoon, Florida. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 61: 229–241.
- Pathak, S. P. & K. Gomal.** 2007. Bacterial Contamination and Antibiotic Resistance in Fecal Coliforms from Glacial Water Runoff. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79: 163–167.
- Pereira A., A. Santos, M. Tacão, A. Alves, I. Henriques & A. Correia.** 2013. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Sci. Total Environ.* 461–462: 65–71.
- Peters, N. E.** 2009. Effects of urbanization on stream water quality in the city of Atlanta, Georgia, USA. *Hydrol. Process.* 23 (20): 2860–2878.
- Plummer, J. D. & S. C. Long.** 2007. Monitoring source water for microbial contamination: Evaluation of water quality measures. *Water Res.* 41 (16): 3716–3728.
- Ramer, M. R., T. T. Reichard, P. J. Tolson & M. M. Christopher.** 2007. Biochemical reference intervals and intestinal microflora of free-ranging Ricord's iguanas (*Cyclura ricordii*). *J. Zoo Wildl. Med.* 38 (3): 414–419.
- Reinthal, F., J. Posch, G. Feierl, G. Wust, D. Haas, G. Ruckenbauer, F. Mascher & E. Marth.** 2003. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37 (8): 1685–1690.
- Riveros Guardia, N. E.** 2003. Análisis y diagnóstico del recurso hídrico en el área de influencia del arroyo Agua Negra. Trabajo Final de Licenciatura. Carrera de Biología – Orientación Ecología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de San Juan. 50 pp.
- Rompré, A., P. Servais, J. Baudart, M. de-Roubin & P. Laurent.** 2002. Detection and enumeration of coli-

- forms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods*. 49: 31–54.
- Sarter, S., H. N. Kha Nguyen, L. Thanh Hung, J. Lazard & D. Montet.** 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18: 1391–1396.
- Schippmann, B., G. Schernewski & U. Gräwe.** 2013. *Escherichia coli* pollution in a Baltic Sea lagoon: A model-based source and spatial risk assessment. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 216 (4): 408–420.
- SPSS for Windows, versión 9.0.** SPSS inc. 1989–1999.
- Staley, C., K. H. Reckhow, J. Lukasik & V. J. Harwood.** 2012. Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake. *Water Res.* 46 (17): 5799–5812.
- Su, H.-C., G.-G. Ying, R. Tao, R.-Q. Zhang, J.-L. Zhao & Y.-S. Liu.** 2012. Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environ. Pollut.* 169: 42–49.
- Suhaim, R., Y. W. Huang & G. J. Burtleb.** 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in channel catfish pond and holding tank water. *LWT* 41: 1116–1121.
- Sullivan, O. J., D. J. Bolton, G. Duffy, C. Baylis, R. Tozzoli, Y. Wasteson & S. Lofdahl.** 2007. Methods for Detection and Molecular Characterization of Pathogenic *Escherichia coli*. The Pathogenic *Escherichia coli* Network. Ashtown Food Research Centre, Teagasc, Ashtown, Ireland. 31 pp.
- Sun, F., M. Chen & J. Chen.** 2011. Integrated Management of Source Water Quantity and Quality for Human Health in a Changing World. *Encyclopedia of Environmental Health*, 254–265.
- Thevenon, F., T. Adatte, W. Wildi & J. Poté.** 2012. Antibiotic resistant bacteria/genes dissemination in lacustrine sediments highly increased following cultural eutrophication of Lake Geneva (Switzerland). *Chemosphere* 86 (5): 468–476.
- Touron, A., T. Berthe, G. Gargala, M. Fournier, M. Ratajczak, P. Servais & F. Petit.** 2007. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Mar. Pollut. Bull.* 54: 1441–1450.
- Trevisan D., J. M. Dorioz, J. Poulenard, P. Quetin, C. P. Combaret & P. Merot.** 2010. Mapping of critical source areas for diffuse fecal bacterial pollution in extensively grazed watersheds. *Water Res.* 44 (13): 3847–3860.
- Van der Oost, R., J. Beyer & N. P. E. Vermeulen.** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2): 57–149.
- Vignesh, S., K. Muthukumar & R. Arthur James.** 2012. Antibiotic resistant pathogens versus human impacts: A study from three eco-regions of the Chennai coast, southern India. *Mar. Poll. Bull.* 64 (4): 790–800.
- Watkinson, A. J., G. B. Micalizzi, G. M. Graham, J. B. Bates & S. D. Costanzo.** 2007. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewaters, Surface Waters, and Oysters from an Urban Riverine System. *Appl. Environ. Microbiol.* 5667–5670.
- Wiest, D. B., J. B. Cochran & F. W. Tecklenburg.** 2012. Chloramphenicol toxicity revisited: a 12-year-old patient with a brain abscess. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 17 (2): 182–188.
- Wright, G. D.** 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (5): 589–594.
- Zar, J. H.** 1999. Biostatistical analysis, 4th Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 931 pp.