

# CALIDAD BACTERIOLÓGICA DEL AGUA DEL RÍO SAN JUAN EN ZONAS ALEDAÑAS A LA DESEMBOCADURA DEL ARROYO LOS TAPONES (SAN JUAN, ARGENTINA)

**ALEJANDRA PASTOR,<sup>1</sup> PATRICIA VARELA,<sup>1</sup>  
VIRGINIA BIANCHI<sup>2</sup> y PATRICIA DURANDO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan, Av. Libertador General San Martín 1109 (Oeste). <sup>2</sup>INIBIOMA, CONICET. Epulafquen 30, Junín de los Andes, Neuquén. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Avenida Valparaíso s/n. E-mail: pdurando@agro.unc.edu.ar

## RESUMEN

En este trabajo se propone: a) determinar la presencia de *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en el agua del río San Juan recolectada aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Taponés (Sitio 1) y en su confluencia con el río mencionado (Sitio 2); b) correlacionar las variaciones en la densidad de las poblaciones bacterianas entre sí y con las variaciones en el caudal y la temperatura del agua del río. En cada sitio se tomaron dos muestras de agua y su temperatura (diciembre 2008–noviembre 2009). Se determinó la presencia de *E. coli* en ambos sitios, no detectándose diferencias significativas entre ellos. Las densidades poblacionales de *Shigella* y *Salmonella*, en el Sitio 1 fueron significativamente menores ( $P=0,0358$  y  $P=0,0045$  respectivamente) que las encontradas en el Sitio 2. Las poblaciones de *E. coli* se correlacionaron positivamente con las bacterias del género *Salmonella* ( $P=0,04$ ) y *Shigella* ( $P=0,03$ ). Además, se encontró una correlación positiva entre las variaciones poblacionales de *Salmonella* con la temperatura del agua ( $P=0,01$ ), mientras que las de *Shigella* correlacionaron en forma inversa con el caudal ( $P=0,02$ ). Estos resultados señalarían el deterioro de la calidad del agua del río San Juan.

### Palabras clave:

bioindicador, contaminación fecal, contaminación del agua.

# BACTERIOLOGICAL QUALITY OF THE WATER OF SAN JUAN RIVER IN THE SURROUNDING AREAS OF THE MOUTH OF LOS TAPONES STREAM (SAN JUAN, ARGENTINA)

**ALEJANDRA PASTOR,<sup>1</sup> PATRICIA VARELA,<sup>1</sup>  
VIRGINIA BIANCHI<sup>2</sup> & PATRICIA DURANDO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan, Av. Libertador General San Martín 1109 (Oeste). <sup>2</sup>INIBIOMA, CONICET. Epulafquen 30, Junín de los Andes, Neuquén. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Ing. Agr. Felix Aldo Marrone 746. Ciudad Universitaria. E-mail: pdurando@agro.unc.edu.ar

## ABSTRACT

The aims of this research are: a) to determine the presence of *Escherichia coli*, *Shigella* spp. and *Salmonella* spp. in San Juan River collected upstream from the mouth of the Los Taponés Stream (Site 1) and in its confluence with the above mentioned river (Site 2); b) to correlate the variations in bacterial population densities between themselves, with the variations in the flow rate and the water temperature of the river. Two samples of water and its temperature were collected from each location (December 2008–November 2009). The results that were obtained have allowed establishing the presence of *E. coli* in both locations; no significant differences were detected between them. As regards *Shigella* and *Salmonella*, their population densities at Site 1 were significantly lower ( $P=0.0358$  and  $P=0.0045$  respectively) than the ones measured at the Site 2. *E. coli* populations were positively correlated with the *Salmonella* and *Shigella* bacteria ( $P=0.03$ ). Besides, the variations in the *Salmonella* populations were positively correlated with the water temperature ( $P=0.01$ ), whereas *Shigella* populations were inversely correlated with the flow rate ( $P=0.02$ ). These results would indicate a serious deterioration in the water quality of San Juan River.

### Key words:

bioindicator, fecal contamination, freshwater pollution.

## INTRODUCCIÓN

Los ambientes acuáticos reciben distintos tipos de desechos urbanos, industriales y/o agrícola ganaderos generados por las actividades antrópicas que afectan seriamente la calidad de sus aguas. En tal sentido, el derramamiento de heces humanas y/o de animales representa una fuente contaminante de alto impacto sanitario y ecológico por la liberación al ambiente de microorganismos fecales, tales como virus, parásitos y bacterias entéricas (Bartram & Ballancer, 1996; Toze, 2006).

Las bacterias entéricas o enterobacterias conforman un grupo de amplia distribución mundial, así denominadas por habitar en el tracto intestinal de los seres humanos, el ganado, los reptiles y las aves, los que actúan como reservorios en la cadena de transmisión (Enriquez *et al.*, 2001; Geue & Löschner, 2002; Corrente *et al.*, 2004; Shellenbarger *et al.*, 2008). Este grupo bacteriano incluye a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella*, relacionados genética y bioquímicamente entre sí, aunque con una marcada heterogeneidad en cuanto a su ecología, tipo de hospedadores que infectan, así como en el potencial patogénico tanto para el hombre como para las distintas especies animales (Brenner & Farmer III, 2009).

Los miembros del género *Escherichia* son organismos comensales de la flora intestinal humana, de animales endotérmicos y de algunos grupos de reptiles (Enriquez *et al.*, 2001; Ramer *et al.*, 2007). Sin embargo, se han identificado cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), que causan enfermedades en el huésped por la presencia de elementos patógenos que habitualmente no están presentes en el género (Sullivan *et al.*, 2007). La cepa de *E. coli* O157: H7 ha sido reconocida como la causante de enterocolitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica, los que pueden ser fatales particularmente en niños (Sullivan *et al.*, 2007; Bolton *et al.*, 2009; Garzio-Hadzick, 2010). A nivel mundial, se emplea a *E. coli* como especie indicadora de contaminación fecal en ambientes acuáticos (Rompré *et al.*, 2002; Reinthaler *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Shellenbarger *et al.*, 2008). Además, su detección puede señalar la presencia probable de otras especies patógenas, tales como las bacterias del género *Shigella* y *Salmonella* (Schaffter & Parriaux, 2002; Chandran *et al.*, 2005).

Las bacterias del género *Shigella* causan una inflamación aguda de la mucosa intestinal denominada shigelosis o disentería bacilar (Cabral, 2010). Este género bacteriano posee una elevada tasa de infectividad, pues se ha demostrado que se requerirían tan sólo 100 células de *Shigella flexneri* para causar enfermedad (DuPont *et al.*, 1989).

El género *Salmonella* posee dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori* (Brenner *et al.*, 2000). Entre ambas especies se han identificado unos 2600 serotipos diferentes, correspondiendo aproximadamente el 60 % a *S. enterica* subespecie *enterica* (Waldner *et al.*, 2012). En humanos, los serotipos patógenos de este género producen distintas enfermedades, tales como la fiebre tifoidea y la salmonelosis (Waldner *et al.*, 2012).

En los últimos años se han incrementado los estudios que señalan la contaminación por bacterias entéricas de las aguas de ríos y ambientes costeros provocada por el tratamiento deficiente en las plantas potabilizadoras de los efluentes urbanos, ganaderos o en el arrastre de heces por escorrentía (An *et al.*, 2002; Lemarchand & Philippe, 2003; Castañeda-Chávez *et al.*, 2005; Garcia-Armisen & Servais, 2007; Suhaim *et al.*, 2008).

Existen antecedentes que establecen la presencia de bacterias coliformes fecales en el río San Juan (San Juan, Argentina) tanto en su cuenca inferior como en la de sus afluentes, los arroyos Los Taponos y Agua Negra (López Pinos, 2003; Riveros Guardia, 2003; Bianchi *et al.*, 2007; Bianchi, 2009). La subcuenca inferior de este río atraviesa el Valle de Tulum en el centro sur de la provincia de San Juan (Lloret & Suvires, 2006). Esta zona se caracteriza por poseer un clima desértico, con un promedio anual de precipitaciones menor a los 100 mm y una humedad promedio de aproximadamente 54 %. Sin embargo, el Valle de Tulum es un oasis creado por irrigación artificial en el que se encuentra la ciudad capital de la provincia. Este valle concentra aproximadamente el 90 % de las actividades económicas que se desarrollan en la provincia (Lloret & Suvires, 2006).

Distintas líneas de evidencias han propuesto que la presencia de enterobacterias en el agua de riego contribuiría a contaminar los cultivos y en consecuencia, a su transmisión a los animales y al hombre al consumirlos (Pachepsky *et al.*, 2011).

En base a los antecedentes presentados, en este trabajo se propone monitorear la calidad bacteriológica del agua del río San Juan en zonas próximas a la desembocadura del arroyo Los Taponos, a fin de establecer si sus aguas son aptas para sustentar la actividad agrícola ganadera de una zona con severas restricciones hídricas.

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos:

a) Investigar la presencia de *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en muestras de agua del río San Juan recolectadas 500 m aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Taponos (Sitio 1) y a la altura de su confluencia con el río (Sitio 2).

b) En caso de detectar la presencia de bacterias de los géneros *Shigella* y *Salmonella*, identificar en forma presuntiva a nivel de especie mediante técnicas bioquímicas.

c) Correlacionar las variaciones de las densidades poblacionales de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. entre sí y con las variaciones en el caudal y la temperatura del agua del río San Juan en las zonas muestreadas, a fin de conocer: si la detección de *E. coli* permite predecir la presencia de los otros dos géneros bacterianos y si la densidad de sus poblaciones se modifican en relación con cambios en dichas variables ambientales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

La subcuenca inferior del río San Juan abarca un área de 7823 km<sup>2</sup> y se extiende desde el dique José Ignacio de la Roza hasta la laguna de Guanacache en la Provincia de Mendoza (Lohn, 1978). El río San Juan responde a un régimen de tipo nival, con ciclos pluri-anales de sequía y de abundancia de agua conforme la nieve caída en las cumbres de los Andes (Lloret & Suvires, 2006). Sin embargo, el caudal de la subcuenca inferior del río San Juan se encuentra regulado artificialmente por la acción del hombre a partir de la mayor o menor liberación de agua desde el dique compensador José Ignacio de la Roza por el Departamento de Hidráulica (dependiente del Ministerio de Infraestructura y Tecnología de la Provincia de San Juan). En cercanías de la ciudad de San Juan, el río recibe el aporte de agua de los arroyos Agua Negra y Los Tapones (Lohn, 1978). En las nacientes del arroyo Los Tapones se vierten los efluentes industriales y cloacales provenientes de la planta depuradora de sólidos del Bajo Segura, ubicada a aproximadamente 10 km de la confluencia.

### SITIOS Y PERÍODO DE MUESTREO

Se seleccionaron dos sitios de muestreo: uno ubicado a una distancia aproximada de 500 m aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Tapones en el río San Juan (Sitio 1) (31° 36' 8,73" S; 68° 23' 13,76" O) y el otro en la confluencia de dicho arroyo con el río San Juan (Sitio 2) (31° 36' 55,91" S; 68° 20' 55,34" O) (Figura 1). El sitio 1 se eligió para contar con valores de referencia para las densidades poblacionales de los microorganismos en estudio. El sitio 2 se escogió para monitorear la calidad del agua usada para riego considerando que, en el arroyo Los Tapones, se vierten líquidos cloacales (Bianchi *et al.*, 2007).

Las muestras se tomaron 20 cm por debajo de la superficie del agua, con una periodicidad de 30 a 45 días, entre diciembre del 2008 y noviembre del 2009, en recipientes de vidrio estériles. Éstas se transportaron en conservadoras acompañadas de refrigerantes. El tiempo transcurrido entre la obtención de las muestras y su traslado al laboratorio nunca superó los 40 minutos (APHA, 1998). Además, en cada sitio, se registró la temperatura del agua al momento del muestreo.

### ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DEL AGUA

Las muestras de agua se procesaron antes de las 12 h. de su recolección. La identificación y cuantificación de *E. coli* y de las especies bacterianas de los géneros *Salmonella* y *Shigella* se efectuaron conforme a los protocolos establecidos por la American Public Health Association (APHA, 1998).



**Figura 1.** A: Mapa de la cuenca inferior del río San Juan señalando la zona analizada. B: Fotografía aérea indicando los sitios de muestreo: el sitio 1 ubicado en el río San Juan a 500 m aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Tapones y el Sitio 2 localizado en la confluencia del mencionado arroyo con el río (tomada de Google maps).

#### IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

Las muestras de agua del río recolectadas en ambos sitios se diluyeron en forma seriada (1: 10, 1: 100, 1: 1000 y 1: 10 000). La población de *E. coli* se cuantificó mediante la técnica estándar cuantitativa de tubos múltiples, mediante el número más probable (NMP) con series de cinco tubos. El cálculo de la densidad bacteriana se realizó conforme lo establecen las normas internacionales de APHA (sección 9221C, 1998). A partir de los tubos con desarrollo bacteriano se realizó un aislamiento selectivo sobre medio EMB (Britania) en placas de Petri, incubadas a 37 °C, durante 48 h. La determinación de la especie se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, tales como el IMViC (indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato) y tinción de Gram (APHA, 1998).

## IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LOS GÉNEROS *Shigella* Y *Salmonella*

Las muestras de agua del río San Juan recolectadas en ambos sitios se diluyeron en forma seriada (25 %, 15 %, 5 % y 1 %). El recuento bacteriano de cada dilución de las muestras tomadas en el Sitio 1, se realizó mediante la técnica de siembra directa en placa de Petri y la técnica de filtración por membrana.

En la siembra directa se realizó un preenriquecimiento colocando 100 ml de cada dilución en 100 ml agua peptonada bufferada a doble concentración. En la filtración, se tomaron 100 ml de cada dilución y se los filtró a través de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (tipo Millipore) en filtro tipo Sartorius de acero inoxidable. A continuación, se colocaron las membranas en 100 ml del medio de cultivo de preenriquecimiento (agua peptonada bufferada).

El recuento bacteriano de las diluciones obtenidas de las muestras del Sitio 2, solo se efectuó mediante la técnica de siembra directa debido a la presencia elevada de elementos en suspensión que impidieron la filtración de las mismas.

En todos los casos, los medios de preenriquecimiento se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las densidades bacterianas de los géneros *Shigella* y *Salmonella* se cuantificaron mediante la técnica de tubos múltiples mediante el NMP con cinco repeticiones siguiendo las normas de la APHA (sección 9260D, 1998). En cada serie de tubos se registró la presencia de los distintos géneros bacterianos, empleando medios de enriquecimiento específicos para cada uno de ellos: para el género *Shigella* se usó caldo tripteína soja y para *Salmonella*, caldo tetrionato. En cada medio específico se sembraron distintas diluciones de la suspensión conforme los valores poblacionales esperados (*Salmonella* de  $1 \times 10^1$  a  $1 \times 10^4$  y *Shigella* de  $1 \times 10^1$  a  $1 \times 10^{11}$ ). Los tubos que presentaron desarrollo bacteriano se consideraron positivos para *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. Éstos se sometieron a aislamiento selectivo utilizando los medios *Salmonella Shigella* y verde brillante en placas de Petri. Luego de incubarlas en estufa a 37 °C durante 24 h., se produce la aparición de colonias cuya morfología y coloración permiten distinguir las siguientes especies bacterianas: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* (en medio agar *Salmonella Shigella*) y *Salmonella enteritidis* (en medio agar verde brillante). Finalmente, las especies bacterianas identificadas en forma presuntiva como pertenecientes al género *Salmonella* se confirmaron mediante las siguientes pruebas bioquímicas: agar triple azúcar hierro (TSI) y agar lisina hierro (LIA), mientras que las del género *Shigella* se confirmaron mediante agar TSI (APHA, 1998).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La falta de normalidad y homocedasticidad de los datos referidos a la densidad de las poblaciones bacterianas de *E. coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en muestras de agua del río San Juan determinó la transformación de los datos originales a rangos (Zar, 1999). Éstos se analizaron mediante ANAVA a dos vías (criterios de clasificación y niveles de los mismos: sitios aguas arriba y en la desembocadura del arroyo Los Tapones, meses del año: de abril a noviembre). En el caso particular del recuento bacteriano de *Salmonella* y *Shigella*, los datos obtenidos a partir de las muestras del Sitio 1 se analizaron mediante ANAVA a tres vías, agregando los métodos de aislamiento bacteriano (siembra directa y filtración) como criterio de clasificación. Para identificar los grupos estadísticamente diferentes se empleó la prueba *a posteriori* de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD Fisher).

Por otra parte, se utilizó el índice de correlación de Spearman para establecer si existía correlación entre las variaciones de las densidades de las distintas poblaciones bacterianas entre sí y con la temperatura (°C) del agua —registrada al momento del muestreo— y/o con el caudal medio del río para cada mes (m<sup>3</sup>/s) —medido aguas abajo del dique José Ignacio de la Roza, por la División Irrigación del Departamento de Hidráulica de San Juan.

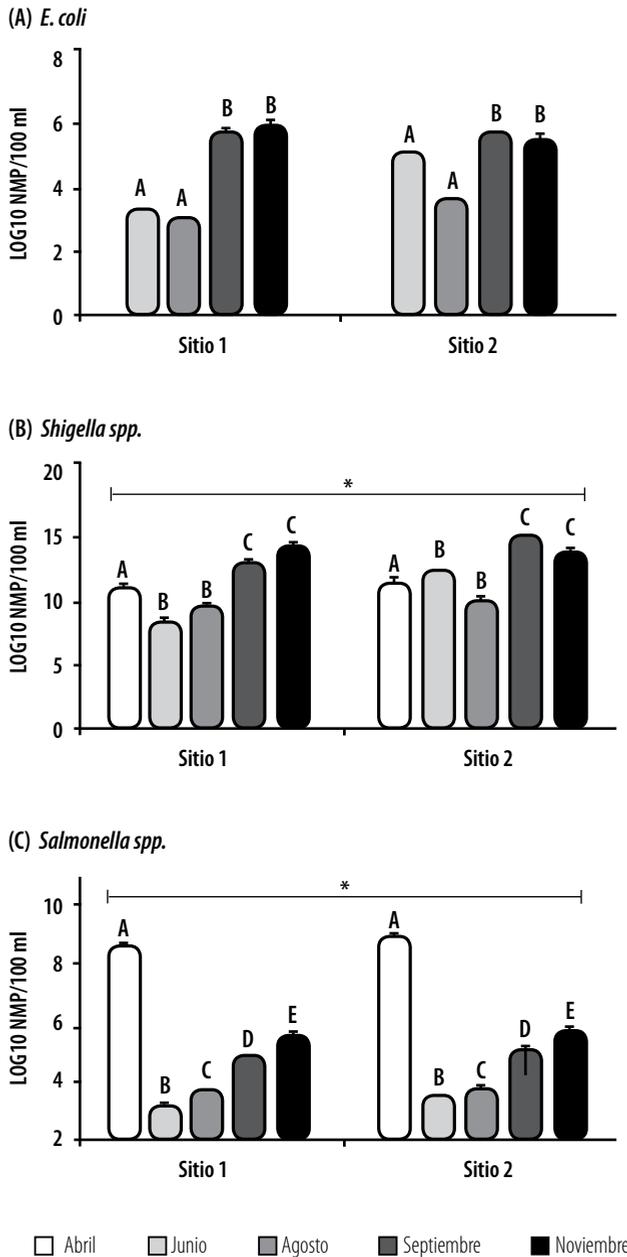
Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico Infostat (2007).

## RESULTADOS

### IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos han permitido establecer la presencia de *E. coli* en las muestras del río San Juan tomadas aguas arriba (Sitio 1) y en la confluencia del arroyo Los Tapones (Sitio 2), no detectándose diferencias significativas entre ambos sitios en lo que respecta a la densidad poblacional y a las variaciones estacionales en las densidades poblacionales (Figura 2A). Cabe destacar que la totalidad de las muestras analizadas resultaron positivas para *E. coli* (n= 14).

Durante el período analizado, se determinó que las densidades de las poblaciones bacterianas aisladas —en ambos sitios— durante los meses de junio y agosto (invierno) resultaron significativamente menores (P= 0,0024) que las detectadas en septiembre y noviembre (primavera) (Figura 2A).



**Figura 2.** Variaciones en la densidad de: (A) *Escherichia coli*; (B) bacterias del género *Shigella* y (C) bacterias del género *Salmonella* (expresada como  $\log_{10}$  NMP/100ml) en muestras de agua del río San Juan recolectadas aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Tapones (Sitio 1) y en la confluencia del arroyo con el río (Sitio 2). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de la densidad bacteriana. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los meses. (\*) Señala diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los sitios de monitoreo.

#### CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Shigella*

En las muestras recolectadas en ambos sitios de estudio se aislaron bacterias del género *Shigella* (Figura 2B). Los resultados obtenidos señalan que las densidades bacterianas detectadas aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Tapones fueron significativamente menores ( $P= 0,0358$ ) que las medidas en la zona de la desembocadura de este arroyo (Figura 2B).

Además, se observaron diferencias significativas ( $P= 0,0001$ ) en las densidades de las poblaciones bacterianas aisladas en cada uno de los meses del período analizado (de abril a noviembre del año 2009). Así, la densidad de las poblaciones de *Shigella* spp. medida en ambos sitios durante los meses de junio y de agosto resultaron significativamente menores que la del mes de abril, siendo ésta menor que las densidades registradas en septiembre y noviembre.

Por otra parte, mediante las técnicas bioquímicas se pudo establecer presuntivamente que, de la totalidad ( $n= 23$ ) de las muestras analizadas, el 57 % ( $n= 13$ ) correspondió a *Shigella flexneri*, el 4 % ( $n= 1$ ) a *Klebsiella pneumoniae* y el 39 % restante no pertenecía a ninguna de estas especies.

Respecto de la aparición de tales especies bacterianas a lo largo del año, se pudo detectar la presencia presuntiva de *Shigella flexneri* desde el mes de abril al de noviembre del 2009, no encontrándose ni en diciembre del 2008 ni en febrero de 2009. En tanto, *Klebsiella pneumoniae* se identificó sólo en una muestra tomada en diciembre de 2008.

Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en lo que respecta al empleo de la siembra directa y de la filtración en las muestras de agua tomadas aguas arriba de la confluencia del arroyo Los Tapones.

#### CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Salmonella*

Los distintos análisis efectuados han permitido detectar la presencia de bacterias del género *Salmonella* en muestras de agua recolectadas en ambos sitios de estudio (Figura 2C).

Los resultados obtenidos señalan que la densidad bacteriana detectada en el Sitio 1 fue significativamente menor ( $P= 0,0045$ ) que la medida en el Sitio 2.

Además, se observaron diferencias significativas ( $P= 0,0001$ ) en las densidades de las poblaciones bacterianas aisladas en cada uno de los meses analizados. En tal sentido, se detectaron niveles crecientes en las densidades poblacionales bacterianas aisladas en ambos sitios durante el periodo analizado.

Mediante las pruebas bioquímicas se pudo establecer presuntivamente que, de la totalidad ( $n= 49$ ), de las muestras analizadas el 51 % ( $n= 25$ ), correspondió a *Salmonella enteritidis*, el 31 % ( $n= 15$ ) a *Salmonella typhimurium* y el 18 % restante no pertenecía a

ninguna de estas especies. Cabe destacar que ambas especies de bacterias se aislaron durante todos los meses analizados, exceptuando febrero, cuando sólo se detectó la primera especie.

Por último, para al género *Salmonella* tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los métodos de siembra directa y de filtración utilizados en las muestras tomadas aguas arriba de la confluencia del arroyo Los Tapones.

#### DETERMINACIÓN DE LAS VARIACIONES DE LAS DENSIDADES POBLACIONALES DE *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. Y *Shigella* spp. CON LA TEMPERATURA DEL AGUA Y EL CAUDAL DEL RÍO

Se encontró una correlación positiva entre la densidad de *E. coli* detectada en las muestras de agua y la de las bacterias del género *Salmonella* ( $P= 0,04$ ) y *Shigella* ( $P= 0,03$ ) (Tabla 1).

Por otra parte, la densidad de las poblaciones bacterianas del género *Salmonella* se correlacionó positivamente con la temperatura del agua ( $P= 0,01$ ) y mientras que las del género *Shigella* lo hicieron en forma inversa con el caudal ( $P= 0,02$ ) (Tabla 1).

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	Temperatura del agua	Caudal del río San Juan
<i>Escherichia coli</i>	1	0,04	0,03	0,06	0,07
<i>Salmonella</i>	0,76	1	0,14	0,01	0,08
<i>Shigella</i>	0,83	0,49	1	0,13	0,02
Temperatura del agua	0,7	0,81	0,5	1	0,04
Caudal del río San Juan	-0,69	-0,59	-0,78	-0,69	1

**Tabla 1.** Matriz de correlación para las densidades de poblaciones bacterianas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (NMP/100 ml de agua), la temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ ) y el caudal del río San Juan ( $\text{m}^3/\text{s}$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de *E. coli* y de bacterias de los géneros *Salmonella* y *Shigella* en las muestras de agua del río San Juan obtenidas en sitios aledaños a la desembocadura del arroyo Los Taponos.

Con relación a *E. coli*, se ha determinado que las densidades de sus poblaciones no varían significativamente entre las muestras del río San Juan recolectadas aguas arriba de la desembocadura del arroyo Los Taponos (Sitio 1) y las muestras obtenidas a la altura de la confluencia del arroyo con el río (Sitio 2). Trabajos previos (Bianchi *et al.*, 2007; Bianchi, 2009) han demostrado la presencia de un gradiente de contaminación por *E. coli* en muestras de agua recolectadas a la altura de la zona de Albardón y San Martín, siendo las densidades de sus poblaciones bacterianas significativamente menores que las detectada en las muestras tomadas a la altura del Puente de Caucete.

Las densidades de las poblaciones de bacterias *Salmonella* y *Shigella* medidas en las muestras recolectadas en el Sitio 1 resultaron significativamente menores que las de las muestras obtenidas a la altura del Sitio 2. Tales diferencias podrían atribuirse a los efectos de distintas fuentes de contaminación. Así, en el Sitio 1 —distante de la desembocadura del arroyo Los Taponos— las poblaciones bacterianas podrían provenir del aporte de fuentes de contaminación de tipo difuso, tales como: filtraciones de pozos sépticos en mal estado, aportes de establecimientos agrícola ganaderos, vertido de heces desde asentamientos urbano marginales, etc. En cambio, en el Sitio 2, el río San Juan recibe el aporte de agua del arroyo Los Taponos en cuya naciente drenan los efluentes cloacales provenientes de la planta depuradora de Bajo Segura. Es por ello que el arroyo representa una fuente de contaminación puntual severa que determinaría el aumento marcado de las densidades de dichas poblaciones bacterianas.

Sobre la base de lo observado por distintos autores, se puede señalar que el arroyo Los Taponos aportaría una mayor carga bacteriana así como elementos sólidos en suspensión, los que contribuirían con el aumento de las poblaciones de ambos géneros bacterianos detectado en el Sitio 2 (Davies *et al.*, 1995; An *et al.*, 2002; Al-Bahry *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010). En tal sentido, se ha comprobado que los sólidos suspendidos en el agua pueden favorecer la supervivencia y/o crecimiento de poblaciones bacterianas al permitir su adsorción y protegerlas de la radiación UV, de la toxicidad por metales y de la depredación por protozoarios (Davies *et al.*, 1995; An *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2010). Además, cantidades elevadas de nitritos y amonio favorecen el incremento poblacional de las bacterias entéricas en aguas que reciben la descarga de efluentes cloacales (Al-Bahry *et al.*, 2009).

Cabe destacar que, en este trabajo, no se midieron ni la turbidez ni el contenido de sólidos disueltos en las muestras de agua del río San Juan. Sin embargo, se podría afirmar, en base al aspecto del agua a simple vista y a la imposibilidad de emplear el método de

filtración, que hubo un aumento marcado de ambos parámetros en las muestra tomadas en el Sitio 2 respecto del Sitio 1. Por esta razón, las muestras obtenidas en la zona de confluencia del arroyo Los Taponos con el río fueron sometidas sólo a siembra directa, en coincidencia con lo establecido por las normas estandarizadas por la APHA (1998).

Por otra parte, se ha comprobado que las densidades de las poblaciones bacterianas de *E. coli* y de los géneros *Salmonella* y *Shigella* —en las muestras de agua de ambos sitios— medidas en junio y agosto resultaron significativamente menores que las de septiembre y noviembre.

Dado que los factores ambientales y las propiedades fisicoquímicas del agua se relacionan directamente con la distribución bacteriana (Hong *et al.*, 2010), se analizó si las variaciones temporales de las distintas poblaciones podrían correlacionarse con las variaciones de la temperatura del agua y/o del caudal del río. En este sentido, pudo establecerse que a mayor temperatura del agua se encontró mayor densidad de las poblaciones bacterianas del género *Salmonella*. En cuanto a las correlaciones de las poblaciones de *E. coli* y de bacterias del género *Shigella* con la temperatura del agua, debemos comentar que, si bien no alcanzaron significación estadística, se observó en ambas poblaciones un incremento en los meses más cálidos (septiembre y noviembre). Estos hallazgos concuerdan con los de otros autores que han demostrado un aumento de las poblaciones entéricas durante los meses de verano cuando las temperaturas del agua son mayores (Haley *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010).

Las densidades de las poblaciones bacterianas del género *Shigella* aumentaron cuando el caudal del río disminuyó —como en septiembre y noviembre—. Si bien el río San Juan responde a un régimen de tipo nival, con abundancia de agua en la época de verano conforme al derretimiento de la nieve caída en las cumbres de los Andes (Lloret & Suvires, 2006), su subcuenca inferior recibe —en este período— menor suministro de agua a partir del dique compensador José Ignacio de la Roza por su desvío a través de canales de riego (datos aportados por el Departamento de Hidráulica dependiente del Ministerio de Infraestructura y Tecnología de la Provincia de San Juan).

Estos resultados coinciden con los encontrados por Jamieson *et al.* (2003), quienes sugieren que, en los períodos de sequía durante los meses de verano, los sedimentos de los cauces de los ríos representan la principal fuente de bacterias coliformes fecales. En consecuencia, se podría proponer que durante los períodos donde disminuye el caudal del río, se produciría un fenómeno de adsorción de bacterias en las partículas de los sedimentos de las márgenes del río. Esta adhesión a las partículas de sedimento les aportaría una mayor disponibilidad de nutrientes, la protección contra la inactivación por radiación solar y la depredación por protozoarios, lo que favorecería un aumento marcado de las poblaciones bacterianas (Davis *et al.*, 2005). En tal sentido, se ha comprobado que la mayoría de las bacterias entéricas presentes en los sistemas acuáticos

está asociada con los sedimentos, y que estas asociaciones influyen su supervivencia (An *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2004). En medios con elevadas concentraciones de electrolitos, las bacterias pueden adsorberse (mediante fuerzas de Van der Waals) débilmente y en forma reversible a las partículas del suelo o de los sedimentos (Jamieson *et al.*, 2004). Ling *et al.* (2002) han determinado que existen diferencias en el porcentaje de unión de *E. coli* a distintos tipos de suelos. Así, el 25 % de una población de *E. coli* se une a suelos limosos (con mayor grado de granulación), mientras que el 99 % se une a suelos arcillosos (con menor grado de granulación y una elevada capacidad de intercambio iónico). Ambos tipos de suelos han sido descritos tanto en las márgenes del río San Juan en zonas aledañas a la confluencia del arroyo Los Taponos como en la cuenca de dicho arroyo (Lloret & Suvires, 2006).

En tanto, durante los meses en los que aumenta el caudal del río ocurriría un fenómeno de resuspensión de tales poblaciones bacterianas, las que serían arrastradas aguas abajo por las corrientes del río (Jamieson *et al.*, 2004).

En este estudio se ha encontrado una correlación significativa positiva entre *E. coli* y las bacterias de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Estos resultados concuerdan lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que considera a *E. coli* como una especie indicadora de contaminación fecal cuya presencia permite inferir la de otras especies bacterianas patógenas (WHO, 2001).

Cabe decir que para la identificación de las especies bacterianas de los géneros *Shigella* y *Salmonella* se utilizaron análisis bioquímicos que permitieron su clasificación taxonómica sobre la base de sus características fenotípicas (Madigan *et al.*, 2009). Tal criterio de clasificación permitió identificar en forma presuntiva a las especies bacterianas como: *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. Considerando estas limitaciones, debe señalarse que la detección de dichas especies resulta importante desde el punto de vista sanitario, pues se ha establecido que el empleo de agua contaminada con heces para riego de cultivos es una de las causas principales de propagación de infecciones bacterianas (Toze, 2006; Pachepsky *et al.*, 2011). La detección de bacterias patógenas entéricas en vegetales y frutas frescas y la elevada incidencia de brotes epidémicos asociados con su consumo han provocado un cambio en el paradigma de la especificidad de sus nichos biológicos sólo en animales y sus productos (Ej: huevos, leche); señalando a las plantas como hábitat secundario (Brandl, 2006). Distintas líneas de evidencias han posibilitado establecer que las bacterias patógenas entéricas encuentran microhábitats en las superficies, las frutas y las semillas de los vegetales, cuyas condiciones favorecen su crecimiento y supervivencia (Brandl, 2006). Así, se ha detectado a *Salmonella enterica* asociada a las nervaduras de las hojas de perejil (Brandl & Mandrell, 2002) y a *E. coli* O157: H7 en las nervaduras de hojas de lechuga (Takeuchi & Frank, 2001). Distintos autores han demostrado la persistencia de bacterias entéricas

patógenas en frutas y hojas de vegetales por períodos de tiempo prolongados. Se ha establecido que *E. coli* sobrevive 77 días en cultivos de lechuga regadas con aguas contaminadas y 177 días en cultivos de perejil (Islam *et al.*, 2004). Por otra parte, *Salmonella typhimurium* pueden sobrevivir 63 días y 231 días en lechuga y perejil cultivados bajo las mismas condiciones (Islam *et al.*, 2004). Exceptuando el registro de *E. coli* correspondiente al Sitio 1 y al mes de agosto, las densidades poblacionales detectadas en ambos sitios y en todos los meses superaron el valor de 1000 MPN/100 ml establecido por la OMS como límite para la irrigación de cultivos que se consumen crudos (WHO, 1989).

En conclusión, la detección de enterobacterias de los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella* en las aguas del río San Juan indicaría la contaminación de sus aguas por heces provenientes tanto de fuentes puntuales como difusas. La presencia de tales géneros bacterianos representa un serio riesgo sanitario ante la posibilidad de contar con agentes patógenos potencialmente transmisibles a cultivos y de allí al hombre, si se considera que la mayor proporción de la actividad agrícola del Valle de Tulum se sustenta en el riego artificial con el agua del río San Juan.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencias y Técnica de la Universidad Nacional de San Juan por subsidiar este proyecto de investigación (CICITCA21/ E 835). Al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería, por brindar el lugar de trabajo. Al Instituto Nacional del Agua, Centro Regional de Aguas Subterráneas (INA-CRAS) por la entrega de mapas del río San Juan. A la División Irrigación, del Departamento de Hidráulica de San Juan por el aporte de los datos del caudal del río San Juan.

**Recibido | Received:** 12 de febrero de 2014

**Aceptado | Accepted:** 01 de octubre de 2014

## REFERENCIAS

- Al-Bahry, S. N., I. Y. Mahmoud, K. I. A. Al-Belushi, A. E. Elshafie, A. Al-Harthy, & C. K. Bakheit.** 2009. Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere* 77:1534–1539.
- American Public Health Association (APHA).** 1998. AD Eaton, LS Clesceri & AE Greenberg (eds). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Water Works Association, Water Pollution Control Federation*, Washington DC, 1325 pp.
- An, Y. J., D. H. Kampbell & G. P. Breidenbach.** 2002. *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environ. Pollut.* 120:771–778.
- Bartram, J. & R. Ballancer.** 1996. Water Quality Monitoring: A practical guide to the design and implementation of freshwater. Quality Studies and Monitoring Programmes. Published on behalf of United Nations Environment Programme and the World Health Organization.
- Bianchi, V., P. Varela, D. Flores, E. Pucheta & P. Durando.** 2007. Empleo de *Escherichia coli* como especie bioindicadora de la calidad del agua del río San Juan. *Rev. Argen. Microb.* 39:159.
- Bianchi, V.** 2009. Evaluación de *Escherichia coli* resistente a antibióticos como especie bioindicadora de contaminación fecal en agua y peces en la cuenca inferior del Río San Juan. Trabajo Final de Licenciatura. Carrera de Biología – Orientación Ecología. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de San Juan, 58 pp.
- Bolton, D. J., G. Duffy, C. J. O. Neill, C. L. Baylis, R. Tozzoli, S. Morabito, Y. Wasteson & S. Lofdahl.** 2009. Epidemiology and transmission of pathogenic *Escherichia coli*. The Pathogenic *Escherichia coli* Network. *Ashtown Food Research Centre*, Teagasc, Ash-town, Ireland, 19 pp.
- Brandl, M. T. & R. E. Mandrell.** 2002. Fitness of *Salmonella enteric* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3614–3621.
- Brandl, M. T.** 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:367–392.
- Brenner, D. J. & J. J. Farmer III.** 2009. Order XIII. Enterobacteriales (587–607). In: GM Garrity Bergey (ed.) Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria, Springer. USA.
- Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe & B. Swaminathan.** 2000. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38:2465–2467.
- Cabral, J. P.** 2010. Water microbiology bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7: 3657–3703.
- Castañeda-Chávez, M., V. Pardo Sedas, E. Orrantia Borunda & F. Lango Reynoso.** 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 50:1641–1648.
- Chandran, A. & A. A. Mohamed Hatha.** 2005. Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in a tropical estuary. *Water Res.* 39:1397–1403.
- Corrente, M., A. Madio, K. G. Friedrich, G. Greco, C. Desario, S. Tagliabue, M. D’Incau, M. Campolo & C. Buonavoglia.** 2004. Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *J. Appl. Microbiol.* 96:709–715.
- Davies, C. M., J. A. H. Long, M. Donald & N. J. Ashbolt.** 1995. Survival of fecal microorganisms in ma-

- rine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1888–1896.
- Davis, K., M. A. Anderson & M. V. Yates.** 2005. Distribution of indicator bacteria in Canyon Lake, California. *Water Res.* 39: 1277–1288.
- DuPont, H. L., M. M. Levine, R. B. Hornick & S. B. Formal.** 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* 159:1126–1127.
- Enriquez C., N. Nwachuku & C. P. Gerba.** 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. *Rev. Environ. Health* 16:117–131.
- García-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.* 44:2753–2762.
- Geue, L. & U. Löschner.** 2002. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Vet. Microbiol.* 84:79–91.
- Haley, B. J., D. J. Cole & E. K. Lipp.** 2009. Distribution, diversity, and seasonality of waterborne *Salmonellae* in a rural watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1248–1255.
- Hong, H., J. Qiu & Y. Liang.** 2010. Environmental factors influencing the distribution of total and fecal coliform bacteria in six water storage reservoirs in the Pearl River Delta Region, China. *J. Environ. Sci.* 22:663–668.
- Infostat.** 2007. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Islam, M., M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner & X. Jiang.** 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J. Food Prot.* 67:1365–1370.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner & X. Jiang.** 2004. Persistence of *Salmonella enteric serovar typhimurium* on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathog. Dis.* 1:27–35.
- Jamieson, R., R. Gordon, D. Joy & H. Lee.** 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters: A review of current watershed scale modeling approaches. *Agr. Water Manage.* 70:1–17.
- Jamieson, R., R. Gordon, S. Tattrie & G. Stratton.** 2003. Sources and persistence of fecal coliform bacteria in a rural watershed. *Water Qual. Res. J. Can.* 38:33–47.
- 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.
- Lemarchand, K. & L. Philippe.** 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:203–209.
- Ling, T., E. Achberger, C. Drapcho & R. Bengtson.** 2002. Quantifying adsorption of an indicator bacteria in a soil–water system. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 45:669–674.
- Lloret, G. & G. M. Suvires.** 2006. Groundwater basin of the Tulum Valley, San Juan, Argentina: A morpho–hydrogeologic analysis of its central sector. *J. South Am. Earth Sci.* 21:267–275.

- 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 Taponés, 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.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap & D. P. Clark.** 2009. Brock Biología de los microorganismos. *Pearson Educación*, España, 1259 pp.
- 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.
- Ramer, M. R., T. Reichard, P. J. Tolson & M. M. Christopher.** 2007. Biochemical reference intervals and intestinal microflora of free-ranging Ricord's iguanas (*Cycluracordii*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 38:414–419.
- Reinthal, F., J. Posch, G. Feierl, G. Wust, D. Haas, G. Ruckebauer, F. Mascher & E. Marth.** 2003. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37:1685–1690.
- 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 coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49:31–54.
- Schaffter, N. & A. Parriaux.** 2002. Pathogenic-bacterial water contamination in mountainous catchments. *Water Res.* 36:131–139.
- Shellenbarger, G. G., N. D. Athearn, J. Y. Takekawa & A. B. Boehm.** 2008. Fecal indicator bacteria and *Salmonella* in ponds managed as bird habitat, San Francisco Bay, California, USA. *Water Res.* 42:2921–2930.
- Suhaim, R., Y.-W. Huang & G. J. Burtle.** 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in channel catfish pond and holding tank water. *LWT – Food Science and Technology* 41:1116–1121.
- Takeuchi, K. & J. F. Frank.** 2001. Expression of red-shifted green fluorescent protein by *Escherichia coli* O157:H7 as a marker for the detection of cells on fresh produce. *J. Food Prot.* 64:298–304.
- Toze, S.** 2006. Reuse of effluent water—benefits and risks. *Agric. Water Manage.* 80:147–159.
- Waldner, L. L., K. D. MacKenzie, W. Köster & A. P. White.** 2012. From exit to entry: Long-term survival and transmission of *Salmonella*. *Pathogens* 1:128–155.
- World Health Organization (WHO).** 2001. Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. *IWA Publishing*, London, UK. 424 pp.
- World Health Organization (WHO).** 1989. Guidelines for the reuse of wastewater in agriculture and aquaculture. *Technical Report Series 778*, Geneva, Switzerland, 74 pp.
- Zar, J. H.** 1999. Biostatistical analysis. *Prentice Hall*, Upper Saddle River, N.J. 931 pp.