



Universidad Nacional del Comahue
Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud
Licenciatura en Saneamiento y Protección Ambiental
“Evaluación de la calidad del agua recreacional, a través de la presencia de miembros del grupo *Enterococcus* en la localidad de Plottier”



Ciudad de Neuquén

Provincia del Neuquén

Año 2019

Alumna: María Eugenia Kovich Legajo: 102371

Directora: Lic. Silvina Desirée Pezzullo. FACIAS – UNCo.

Co- Directora: Esp. Angelina Lidia Illescas. FACIAS – UNCo.

ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS	5
2. RESUMEN.....	6
3. ABSTRACT	8
4. INTRODUCCIÓN	10
5. OBJETIVOS	13
5.1 General: Evaluar la calidad del agua recreacional, a través del miembros del grupo <i>Enterococcus</i> en la localidad de Plottier.	13
5.2 Específicos:	13
6. ANTECEDENTES.....	14
7. MARCO TEÓRICO.....	17
7.1 Calidad del agua recreacional	17
7.2 Indicadores de calidad del agua	17
7.3 Características del miembro del grupo <i>Enterococcus</i>	19
7.4 Marco Legal	20
8. METODOLOGÍA	21
8.1 Área de estudio.....	21
8.2 Muestreo.....	23
8.3 Análisis microbiológico	26
8.3.1 Prueba Presuntiva.....	26
8.3.2 Prueba Confirmatoria	27
8.3.3 Prueba Complementaria de doble Verificación.....	27
8.3.3.1 Siembra y Aislamiento	27
8.3.3.2 Prueba Catalasa	27
8.3.3.3 Coloración de Gram	28
8.4 Análisis Físico-Químicos	28
8.5 Caudales	28
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
9.1 Análisis Microbiológicos	29
9.1.1 Prueba Presuntiva	29
9.1.2 Prueba Confirmatoria	29
9.1.3 Prueba Complementaria de doble Verificación.....	31
9.1.3.1 Siembra y Aislamiento	31
9.1.3.2 Prueba Catalasa.....	33

9.1.3.3 Coloración de Gram.....	35
9.2 Análisis Físico-Químicos	37
9.3 Caudales	40
10. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	43
11. BIBLIOGRAFÍA.....	46
12.1 Anexo I: Tabla con datos de muestreo <i>in situ</i>	48
12.2 Anexo II: Datos de control de calidad de la aptitud del agua en áreas recreativas situadas en la localidad de Plottier.....	49
12.3 Anexo III: Tabla del Número Más Probable	50

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Balneario habilitado de Senillosa. Fuente. Elaboración propia.....	22
Imagen 2. Balnearios habilitados de Plottier. Fuente. Elaboración propia.....	23
Imagen 3. a) y b) recolección de muestra N°1 en el Balneario viejo de Senillosa.	24
Imagen 4. a) Sitio de muestreo N° 2, b) medición de parámetros físico químicos.	24
Imagen 5. a) Sitio de muestreo, b) recolección de muestra N° 3.	25
Imagen 6. a) Sitio de muestreo, b) recolección de muestra N° 4.	25
Imagen 7. Instrumental utilizado en el muestreo.	26
Imagen 8. a) Tubos múltiples negativos (-), b) tubos positivos (+).	29
Imagen 9. Prueba confirmatoria, a) adición de ClNa al 6,5%; b) tubos positivos (+), confirmación de <i>Enterococcus</i>	30
Imagen 10. a), b) y c) placas con desarrollo típico de colonias de <i>Enterococcus</i> marcadas con círculo rojo.	31
Imagen 11. Aislamientos en pico de flauta con desarrollos de <i>Enterococcus</i>	32
Imagen 12. En el porta objetos a) reacción positiva (+) a catalasa y en el porta objetos b) reacción negativa (-) a catalasa.....	33
Imagen 13. Procedimiento de la coloración de Gram.	35
Imagen 14. a), b) y c) fotos a través de lo observado en el microscopio de <i>Enterococcus</i>	36
Imagen 15. Visualización de cadenas cortas o pares de <i>Enterococcus</i> marcadas con círculo negro.	37
Imagen 16. Parámetros que se utilizan para evaluar la calidad en las zonas recreativas en la Localidad de Plottier. Fuente proporcionada por Marcos García gerente de EDEP (Ente de Desarrollo Económico Plottier).....	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resultado de prueba catalasa.	34
Gráfico 2. Período Marzo – Abril. Fuente. Elaboración propia.	38
Gráfico 3. Período Marzo – Abril. Fuente. Elaboración propia.	38
Gráfico 4. Período Marzo – Abril. Fuente. Elaboración propia.	39
Gráfico 5. Período Marzo- Abril. Fuente. Elaboración propia.	39
Gráfico 6. Datos aportados por al AIC, en función a caudales; en el recuadro color rojo se marca el caudal del día del muestreo. Fuente AIC.	40
Gráfico 7. Datos aportados por la AIC, en función de los caudales; en el recuadro de color rojo se marca el caudal del día del muestreo. Fuente AIC.	41
Gráfico 8. Variación espacial y temporal de <i>Enterococcus</i> en los diferentes sitios de muestreo. Fuente. Elaboración propia.	41

1. AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a mi esposo Darío y a mi hija Emilia por el apoyo incondicional que me brindaron en este último tramo de mi carrera, para culminar con mis estudios. También a mis padres y hermanos, quienes fueron los que me apoyaron cuando comencé a estudiar y gracias a ellos es quien soy en esta vida.

A Desirée y Angie por aceptarme como su tesista y por el apoyo que me brindaron durante la etapa de investigación. Son excelentes personas y profesionales, con mucha predisposición en ayudar al otro.

A la Universidad Nacional del Comahue que brinda el acceso a una educación gratuita y de calidad en la formación de profesionales.

A la Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud por brindar la infraestructura para poder realizar mi investigación.

Y por último a Gerardo y Marcela por estar presentes y por su apoyo técnico en el laboratorio.

2. RESUMEN

En la provincia de Neuquén uno de los principales cursos de agua es el río Limay. En su recorrido el río Limay rodea varias localidades, como las localidades de Senillosa y Plottier, donde se encuentran habilitadas las zonas recreativas. En las cuales solo se hace el análisis de *Escherichia coli* que es el indicador internacional tomado como referencia para la habilitación de uso recreativo para las aguas.

Como objetivo principal de este trabajo se evaluó la calidad del agua recreacional, a través de la presencia de miembros del grupo *Enterococcus*. Se tomaron muestras en cuatro sitios habilitados como uso recreacional durante los meses de marzo y abril. Los análisis microbiológicos se realizaron acorde a la metodología de Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (American Public Health Association (APHA, 1992), establecidos para recuento y aislamiento de *Enterococcus* en muestras de agua a través de la Técnica del Número Más Probable (NMP). Además se relevaron parámetros físico-químicos *in situ* como temperatura (°C), pH, conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y sólidos disueltos (ppm).

Como el agua es esencial para la vida, todas las personas deben disponer de un suministro suficiente, inocuo y accesible. Determinar el tipo de microorganismos y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua, control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas. La presencia de indicadores microbiológicos de contaminación fecal es fundamental para la prevención de enfermedades de origen hídrico. Dentro del rango de indicadores se encuentran el grupo de *Enterococcus* formando parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, son excretados junto con las heces, de ahí que su presencia en el ambiente indica contaminación de origen fecal y riesgo de aparición de gérmenes patógenos. El grupo *Enterococcus* es considerado buen indicador, poseen más mecanismos de resistencia que los coliformes ya que sobreviven a condiciones de pH entre 4,6 a 9,6-10 y a temperaturas que van de 10°C a 45°C.

Los datos obtenidos en el presente trabajo de tesis, evidencian la presencia del grupo *Enterococcus* en los sitios analizados en las aguas del río Limay, de un total de 53

aislamientos realizados, 20 (37,76%) resultaron negativos a la prueba Catalasa. Esto significa que dichas cepas pertenecen al grupo de los *Enterococcus* ya que no presentaron burbujas al adicionar peróxido de hidrógeno, en esta prueba. Estos resultados se consideran relevantes debido a que no se realizan determinaciones del grupo *Enterococcus* en los monitoreos que realiza la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC) en la zona de estudio.

Cabe destacar la importancia de estos monitoreos ya que los resultados obtenidos en este estudio superan los límites establecidos por el Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 33 *Enterococcus*/100 ml, niveles guías internacionales con los que se comparan, mientras en Argentina se elabore una normativa propia pertinente a aguas recreativas.

Palabras claves: *Enterococcus*, agua recreacional, parámetros físico-químicos, calidad del agua.

3. ABSTRACT

In the province of de Neuquén, one of the main water courses is the Limay River. On its way the Limay River surrounds several towns, such as the town of Senillosa and Plottier, where recreational areas are enabled. In which only the *Escherichia coli* analysis is made, which is the international indicator taken as a reference for the authorization of recreational use for water.

As main objective of this work, the quality of recreational water was evaluated, through the presence of members of the *Enterococcus* group. Samples were taken at four sites enabled as recreational use during the months of March and April. The microbiological analyzes were performed according to the methodology of Standardized Methods for the Analysis of Drinking and Wastewater (American Public Health Association (APHA, 1992), established for count and isolation of *Enterococcus* in water samples through the Number Technique Plus Probable (NMP). In addition, physical-chemical parameters were relieved in situ such as temperature, pH, conductivity and dissolved solid.

As water is essential for life, all people must have a sufficient, safe and accessible supply. Determining the type of microorganisms and their concentration provides essential tools to know water quality, spill control, water treatment and ecosystem conservation. The presence of microbiological indicators of faecal contamination is essential to be able to predict certain diseases of water origin. Within the range of indicators are the *Enterococcus* group forming part of the microbiota of the gastrointestinal tract of man and warm-blooded animals, they are excreted by feces; hence their presence in the environment indicates contamination of fecal origin and risk of occurrence of pathogenic germs. The *Enterococcus* group is considered a good indicator; they have more resistance mechanisms than coliformes since they survive at pH conditions between 4.6 to 9.6-10 and at temperatures ranging from 10 ° C to 45 ° C.

The data obtained in this thesis work, show the presence of the *Enterococcus* group in the sites analyzed in the waters of the Limay River, out of a total of 53 isolates performed, 20 (37.76%) were negative for the Catalase test. This means that these strains belong to the

Enterococcus group since they did not show bubbles when adding hydrogen peroxide, in this test. These results are considered relevant because no *Enterococcus* group determinations are made in the monitoring carried out by the Interjurisdictional Basin Authority (AIC) in the study area.

It is important to highlight the importance of these monitoring since the data obtained in this study exceed the limits established by the United Nations Environment Program (UNEP) and the World Health Organization (WHO) of 33 *Enterococcus* / 100 ml, international guide levels with which they are compared, while in Argentina an own regulation pertinent to recreational waters is elaborated.

Keywords: *Enterococcus*, recreational water, physical-chemical parameters, water quality.

4. INTRODUCCIÓN

En la provincia de Neuquén uno de los principales cursos de agua es el río Limay, que tiene su nacimiento en el lago Nahuel Huapi. El lago es de origen glaciario, considerado oligotrófico, que significa con bajo contenido de nutrientes. El río Limay fluye en dirección noreste formando la frontera entre las provincias de Neuquén y Río Negro, hasta confluir con el río Neuquén. En su recorrido en la provincia de Neuquén, el río Limay rodea varias localidades. En este trabajo de tesis se tomaron muestras en las localidades de Senillosa y de Plottier, donde se encuentran habilitadas las zonas recreativas (Martínez, 2009).

La localidad de Senillosa cuenta con el balneario viejo de Senillosa, el cual está habilitado con fines recreativos y la localidad de Plottier cuenta con zonas habilitadas como el balneario Municipal y La Herradura, en donde sólo se hace análisis de *Escherichia coli* que es el indicador internacional tomado como referencia por las autoridades de aplicación para la habilitación de los sitios para uso recreativo (Guías Canadienses).

Como el agua es esencial, para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro suficiente, inocuo y accesible, el 28 de Julio de 2010 la Asamblea General de las Naciones Unidas aprobó una resolución que reconoce al agua potable y al saneamiento básico como derecho humano esencial para el pleno disfrute de la vida (Álvarez, 2016).

La calidad del agua se clasifica dependiendo del uso para el cual va a ser empleada, ya sea para uso recreativo, uso doméstico, uso agrícola y ganadero, como hábitat para organismos acuáticos, entre otros. Para determinar la aptitud del agua en las zonas consideradas como balnearios, se adoptaron los criterios expuestos en la Guías Canadienses de Calidad de agua, analizándose la bacteria *Escherichia coli*, considerada como el mejor indicador de contaminación de origen fecal, tanto humano como de otros animales de sangre caliente. El riesgo de contaminación tanto a nivel humano como ambiental hace necesario el control de la presencia de microorganismos en el agua. Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas (Pinilla Campo, 2001).

La mayoría de los parámetros para evaluar la calidad del agua son de carácter físico-químico. El seguimiento y la vigilancia se llevan a cabo mediante la toma periódica de muestras y su posterior análisis. El término “Calidad”, referido a aguas continentales, no es un concepto absoluto ni de fácil definición. Por el contrario es un concepto relativo, que depende del destino final del recurso. Como a modo de ejemplo no podemos considerar las aguas fecales de calidad apropiadas para bebida, por los problemas sanitarios que conllevaría su uso (Alba Tercedor, 1994).

Contar con indicadores microbiológicos de contaminación fecal es fundamental para poder prever ciertas enfermedades de origen hídrico, siendo la ruta fecal-oral la vía principal de infección (Rossen, 2007). Al estar los usuarios en contacto primario como las actividades de inmersión tales como natación y buceo con este tipo de agua, es fundamental conocer el estado sanitario de las mismas. Por esto es importante monitorear las aguas recreativas que están afectadas por contaminación de líquidos cloacales, que pueden tener un alto riesgo de contaminación a través de bacterias patógenas (Nadal *et. al*, 2012).

Para evaluar la calidad sanitaria del agua, tanto para consumo como para uso recreacional, se llevan a cabo estudios de presencia de diferentes bacterias, como indicadores de contaminación fecal. Al no encontrarse un indicador universal ya que hay diferentes criterios internacionales se debe utilizar el más apropiado para la situación específica de estudio. Dentro del rango de indicadores se encuentran las bacterias coliformes, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y el grupo *Enterococcus*. Estos microorganismos se encuentran en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, son excretados junto con las heces, de ahí que su presencia indica contaminación de origen fecal (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

Dentro del grupo de indicadores de contaminación fecal se encuentra el grupo *Enterococcus*, que son considerados buenos indicadores porque mueren más lentamente que los coliformes debido a que son más resistentes a la desecación, a la congelación, sobreviven a condiciones de pH entre 4,6 a 9,6-10 y a temperaturas elevadas que van de 10°C a 45°C. Sin embargo, *Enterococcus* se lo puede encontrar en las aguas marinas, ya que es resistente a las condiciones que presenta el agua salobre, a su temperatura, y tienen mejor relación con las enfermedades gastrointestinales, respiratorias y dermatológicas (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

La presente investigación contribuirá a:

- ✓ Identificar la presencia de *Enterococcus* en el tramo del río Limay en los balnearios habilitados en la localidad de Plottier, balneario Municipal y La Herradura.
- ✓ Evaluar los riesgos que produciría su presencia a nivel de calidad de agua, como uso recreacional.
- ✓ Releva el estado de la calidad del agua, para posterior monitoreo y vigilancia a nivel local.

Partiendo de que el río puede ser un reservorio de bacterias de origen de contaminación fecal, surgen los siguientes interrogantes: ¿El grupo *Enterococcus* está presente en el río?, ¿En qué cantidad se pueden encontrar el grupo *Enterococcus*? ¿A qué se debe la presencia del grupo *Enterococcus*? ¿Qué tipo de *Enterococcus* pueden encontrarse en el tramo del río que se evalúa?

5. **OBJETIVOS**

5.1 General: Evaluar la calidad del agua recreacional, a través del miembros del grupo *Enterococcus* en la localidad de Plottier.

5.2 Específicos:

- Determinar la presencia de *Enterococcus* en las zonas de estudio y su potencial afectación.
- Analizar el recuento de microorganismos a través de la técnica de NMP (Numero más Probable).
- Releva los parámetros Físico-químicos en el sitio de muestreo.
- Comparar los resultados obtenidos con la legislación, Provincial, Nacional e Internacional.

6. ANTECEDENTES

Como punto de partida en el desarrollo de este trabajo de tesis, se tuvieron en cuenta las siguientes investigaciones a nivel internacional, nacional y regional:

- a) Díaz Pérez, M, Rodríguez Martínez, C, & Zhurbenko, R, (2010). “*Aspectos Fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad*”. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología; 48(2) 147-16.

En esta investigación el género *Enterococcus* ha cobrado una gran importancia por su elevada incidencia en las enfermedades nosocomiales y por la adquisición de resistencia a muchos antimicrobianos. En Cuba existen algunos reportes de aislamiento de estos microorganismos en la clínica, el diagnóstico en este sentido es aún es insuficiente, también es escasa o nula la búsqueda de estos microorganismos en aguas y alimentos, por lo que resulta impredecible realizar una revisión bibliográfica sobre esta temática. El objetivo de esta primera revisión consistió en profundizar los aspectos fundamentales del género *Enterococcus*.

- b) Nadal, F., Ruiz M, Rodríguez M. I., Halac, S., & Olivera, P, (2012).” *Evaluación de la calidad de agua para uso recreativo del embalse San Roque*”, Córdoba, Argentina. Instituto Nacional del Agua- Centro de la Región Semiárida, Córdoba.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las zonas balnearias en lo que respecta a microorganismos patógenos (coliformes totales, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* y cianotoxinas (microcistinas totales) del embalse San Roque y verificar si dichos parámetros cumplen con los valores guías establecidos por la EPA, CCE, CONAMA Y WHO.

- c) Gómez, C. L., (2017). “*Evaluación de la calidad ambiental del agua de los Balnearios habilitados del Rio Limay, a través de la presencia del grupo Enterococcus*”. Neuquén Capital, Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad ambiental del agua de los balnearios habilitados del río Limay, a través de la identificación de *Enterococcus*, evaluar el potencial riesgo ambiental y sanitario por presencia de *Enterococcus*, determinar parámetros meteorológicos y fisicoquímicos del agua durante el muestreo, comparar los resultados obtenidos con legislación Internacional, Nacional, Provincial y Municipal vigente.

Los resultados arrojados fueron que de un total de 60 aislamientos, 52 resultados dieron positivos a la presencia de *Enterococcus*, valores que expresan un 86,66% los cuales variaron en lugar época de muestreo. Se determinó, además, que los parámetros climáticos y fisicoquímicos no son un condicionante para la presencia de bacterias del género *Enterococcus*, ya que se encontraron aún en condiciones extremas de pH, sólidos disueltos, conductividad y temperatura. Al comparar con normativas actuales, el riesgo arrojó probabilidades altas, por sobre el 60% en los tres meses de muestreo, generando riesgo en la salud y el ambiente. A su vez, se dejó en evidencia que la implementación de normativas creadas en estudios de otros países, conlleva a cometer sesgos y no son representativos de cada lugar.

- d) Pezzullo, S. D., (2007). *Persistencia de microorganismos coliformes en suelos urbanos con contaminación antrópica discontinua*. Neuquén Capital, Universidad Nacional del Comahue, Escuela Superior de Salud y Ambiente.

El objetivo del trabajo fue investigar la persistencia en suelos urbanos de la ciudad de Neuquén, de microorganismos coliformes, en épocas del año en que las calles no son expuestas al riesgo y determinar el potencial riesgo ambiental y para la salud de las poblaciones cercanas al sitio de estudio. Los resultados arrojados dieron positiva la presencia de bacterias mesófilas heterótrofas aerobias totales, coliformes totales y coliformes fecales, pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Entre los aislamientos se encontraron *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiellas pp*, *Proteus*, *Salmonella*, y *Shigella*.

Existe una correlación entre los parámetros fisicoquímicos encontrados, los registros climáticos de la época y la presencia de éstas bacterias.

- e) Ugolini, F.I., (2006). *Estudio bacteriológico de aguas recreacionales de balnearios del Río Limay en la ciudad de Neuquén*. Neuquén Capital, Universidad Nacional del Comahue, Escuela de Medicina, Cátedra de Microbiología y Parasitología.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible contaminación bacteriana y físico-química de aguas recreacionales del río Limay. A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que la calidad físico-química del agua del período estudiado fue muy buena. Se encontró la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal de cantidad variable de acuerdo a las condiciones del ambiente y variables durante el verano.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Calidad del agua recreacional

El término calidad de agua es relativo y sólo adquiere relevancia cuando está relacionado con el uso del recurso. Un curso de agua suficientemente limpio como para permitir la vida de los peces puede no ser apto para que las personas naden en él, así como un agua apta para consumo humano puede no ser útil para todas las industrias, tal sería el caso de un agua dura. La calidad bacteriológica del agua para bañarse no requiere tener valores tan rigurosos como para consumo, pero debe estar libre de bacterias patógenas. Asimismo, el agua para fines recreativos debe estar libre de contaminantes químicos que presenten toxicidad (López Sardi, 2016).

Cada curso de agua requiere estudios específicos para el tipo de contaminante que lo amenaza, como no hay una normativa que regule sobre el tema y establezca sin lugar a dudas cuáles son los parámetros a considerar y los valores límites admitidos que sean aplicables a los balnearios. Las normas locales suelen ser establecidas para cuerpos de aguas sujetos a descargas puntuales de efluentes cloacales y no son válidas para aquellos ambientes de fuentes dispersas (López Sardi, 2016).

7.2 Indicadores de calidad del agua

El control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente se lleva a cabo mediante indicadores de contaminación fecal. La enumeración de estas bacterias es utilizada para valorar la calidad sanitaria de alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. Las aguas y los alimentos contaminados con microorganismos constituyen un vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas, por otra parte el desarrollo microbiano destruye grandes cantidades de alimentos causando problemas económicos y una considerable pérdida de importantes nutrientes (Díaz Pérez *et al*, 2010).

No existe a nivel internacional un único microorganismo que pueda utilizarse como indicador, por lo que se debe seleccionar el más apropiado para la situación específica en estudio. Dentro del rango de indicadores se encuentran el grupo de bacterias coliformes,

Escherichia coli, colifagos, *Clostridium perfringens* y el grupo de *Enterococcus*. Estos microorganismos se encuentran formando parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, son excretados junto con las heces, de ahí que su presencia en el ambiente indica contaminación de origen fecal y riesgo de aparición de gérmenes patógenos (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

Los productos de alimentos para consumo en la dieta diaria, como vegetales mal lavados pueden contener *Enterococcus* procedentes de una contaminación fecal directa o indirecta debido a la mala higiene en el proceso de elaboración. En los productos semiconservados, procesados por calor pero no estériles, pueden encontrarse *Enterococcus*, que junto con microorganismos esporulados, son con frecuencia los únicos microorganismos sobrevivientes. Los productos mantenidos en el rango de temperatura entre 10°C a 45°C pueden contener valores altos de recuentos de microorganismos (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

El estudio de *Enterococcus* es interesante cuando se analizan muestras de aguas, ya que *Enterococcus bovis* y *Enterococcus equinus*, son indicadores de contaminación por animales de sangre caliente no humana. Además, son especies que más rápidamente mueren en el medio exterior, por eso cuando se detectan, indican una contaminación reciente por animales de granja. También en alimentos tienen su importancia, especialmente en industrias que procesan carne y productos de granja. El análisis de *Enterococcus* además se realiza cuando se trata de aguas de bebida de calidad dudosa como son las muestras de pozos, es decir, aguas subterráneas o aguas que serán utilizadas para recreación (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) propusieron en el año 1983 criterios para la evaluación de aguas con fines recreativos, basados en concentraciones tanto de coliformes fecales como de *Enterococcus*, estableciendo límites para estos últimos de 33 colonias/100 ml de muestra. Estos estudios también demostraron que la sintomatología gastrointestinal asociada con la natación era mucho más predominante entre niños (10 años de edad o menores) por contar con sistemas inmunológicos menos desarrollados que los adultos (Gómez, 2017). Así mismo, la Organización Mundial de la Salud discute la ineficacia de coliformes fecales como indicador de contaminación fecal y debate los méritos de

indicadores alternativos, como *Enterococcus* o *Clostridium* sulfito reductores (Díaz Pérez, 2010).

7.3 Características del miembro del grupo *Enterococcus*

Los miembros del género *Enterococcus* son bacterias Gram positiva, que se encuentran en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre. Puede causar diferentes enfermedades, como endocarditis, infecciones en el tracto urinario, neonatales e infecciones de piel. Las infecciones se deben a la microbiota endógena, aunque pueden ser transmitidas por el contacto de persona a persona, o por consumo de alimentos contaminados, agua contaminada (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

Uno de los principales problemas de las infecciones causadas por la especie, es su manejo terapéutico, porque son resistentes de forma natural o intrínseca a todas las cefalosporinas, clindamicina, lincomicina, trimetropim/sulfametoxazol y aminoglicósidos, tienen una alta capacidad de adquirir resistencia a la ampicilina, clorafenicol, teicoplanina, y vancomicina. La resistencia a vancomicina fue aislada por primera vez en Inglaterra y Estados Unidos, en 1986 y 1989 respectivamente, describiéndose en ambos países el incremento como agente causal de las infecciones nosocomiales (Alarcón López, 2013).

Se pueden encontrar 33 especies pertenecientes al grupo *Enterococcus*, los más frecuentes son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Dentro del grupo de microorganismos de contaminación fecal, *Enterococcus* son considerados buenos indicadores, porque mueren más lentamente que los coliformes, sobreviven a condiciones de pH entre 4,6 a 9,6-10 y a temperaturas elevadas que van de 10°C a 45°C. El grupo *Enterococcus* se lo puede encontrar en las aguas marinas, ya que es resistente a las condiciones que presenta el agua salobre, a su temperatura, y tienen mejor relación con las enfermedades gastrointestinales, respiratorias y dermatológicas (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

7.4 Marco Legal

En la Localidad de Plottier sólo se realiza el control de la Aptitud del agua, realizado por la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC), en las zonas situadas como uso recreativo, balneario Municipal y La Herradura (ver Anexo II).

Las normas locales suelen ser establecidas para cuerpos de aguas sujetos a descargas puntuales de efluentes cloacales y no son válidas, por ejemplo para aquellos ambientes sujetos a fuentes dispersas; estas fuentes pueden representar un riesgo para la salud. En nuestro país no hemos desarrollado un criterio propio (nacional o regional), habiéndose adoptado en ciertos casos, el de otros países u organizaciones. Existen publicaciones de como las “Guías de la Organización Mundial de la Salud para ambientes seguros para aguas recreativas”, la cual clasifica de contacto primario cuando en ellas se desarrollan actividades de inmersión tales como natación, buceo y de contacto secundario cuando se desarrollan actividades como canotaje, remo, pesca deportiva, etc. (López Sardi, 2016).

8. METODOLOGÍA

8.1 Área de estudio

La cuenca del río Limay se encuentra situada en la parte Norte de la Región Patagónica, constituye unos de los sistemas hidrográficos más importantes de la Nación Argentina. El río Limay tiene un módulo de $650 \text{ m}^3/\text{seg}$ y drena un área de 56.000 km^2 (AIC, 2019).

El río Limay se divide en tres tramos, el estudio de este trabajo de tesis se realizó sobre el tramo inferior del río, comprendido entre los balnearios habilitados en las localidades de Senillosa y Plottier. Para evaluar la presencia de miembros del grupo *Enterococcus*. La primera muestra se tomó en el balneario viejo de Senillosa (Sitio 1) ya que es una zona habilitada y se encuentra aguas arriba de la zona de estudio, como se muestra en la Imagen 1. La segunda muestra se recolectó antes del balneario Plottier (Sitio 2), establecido por el municipio de Plottier como paseo de costa, la tercera muestra en el balneario Plottier (Sitio 3) y la cuarta muestra en el balneario La Herradura (Sitio 4) como muestra la Imagen 2.

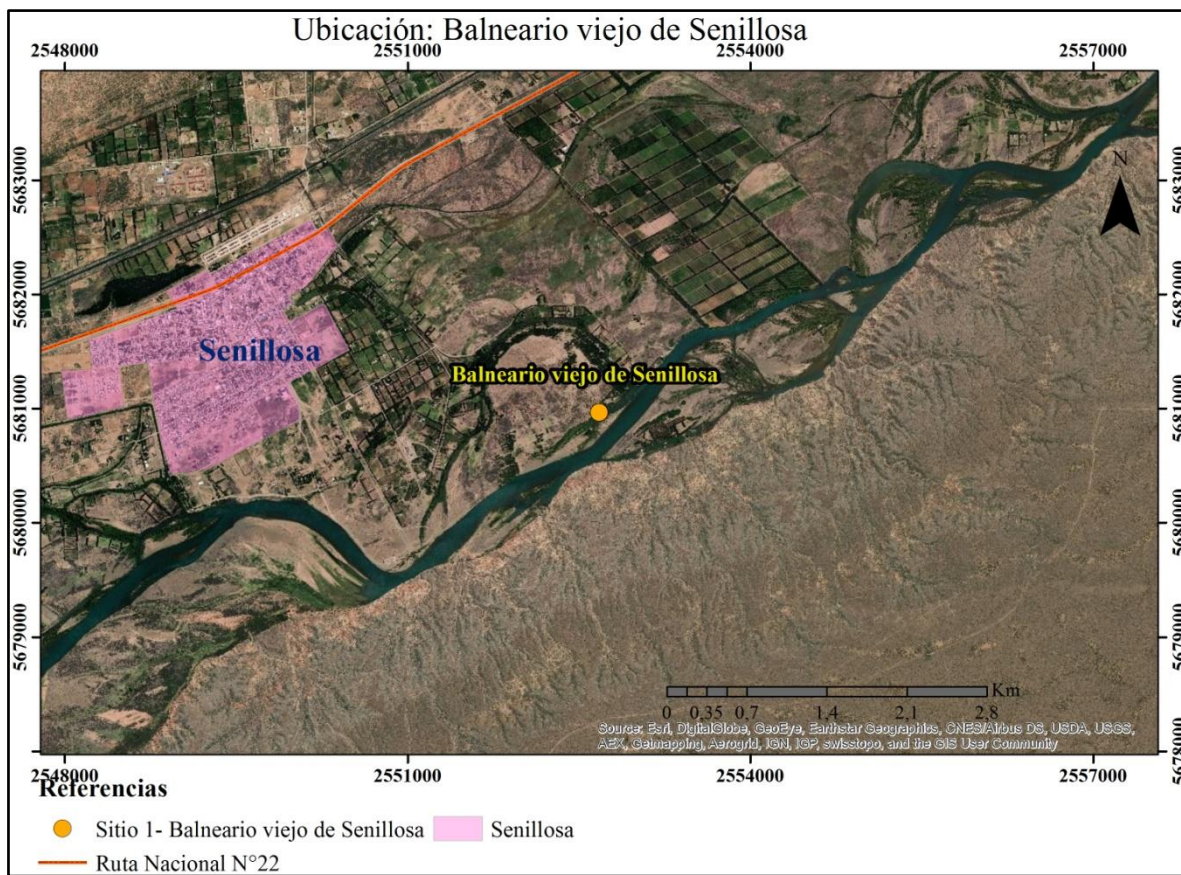


Imagen 1. Balneario habilitado de Senillosa. Fuente. Elaboración propia.

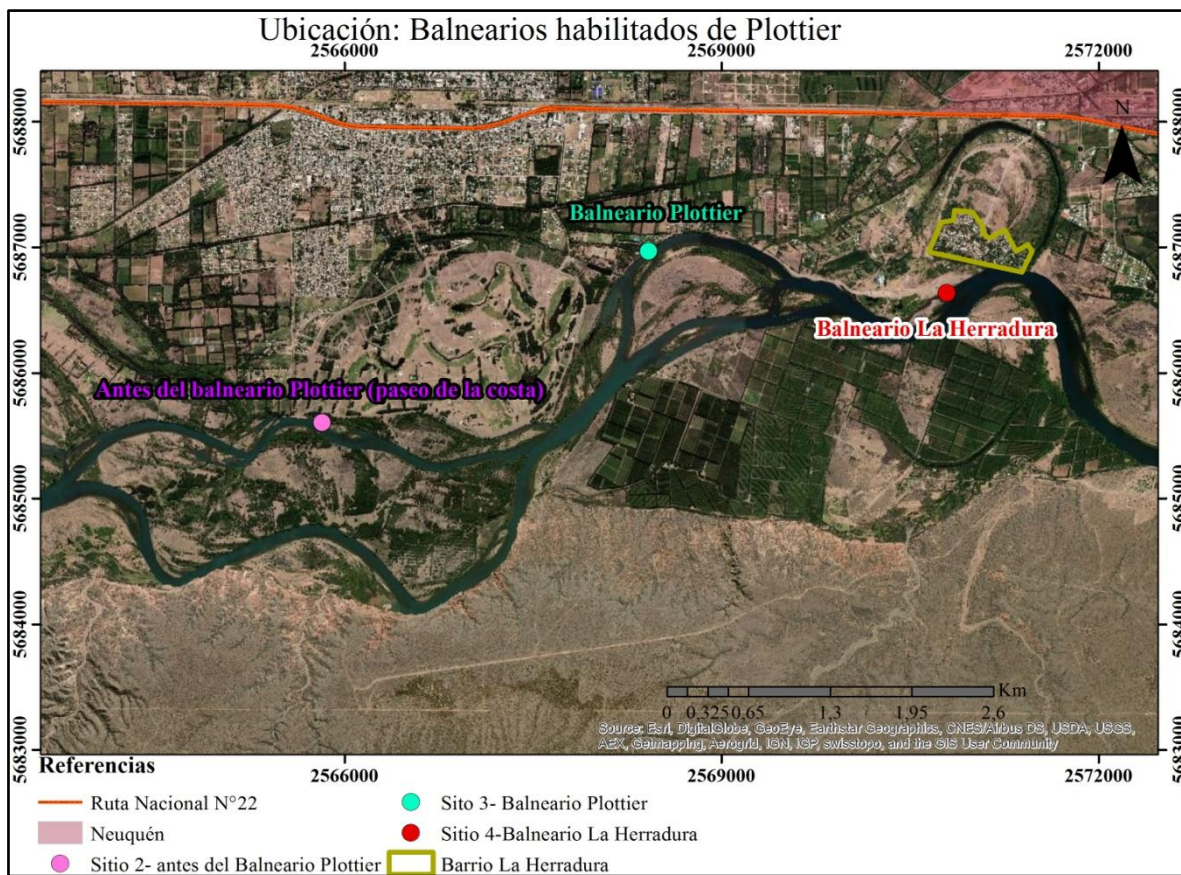


Imagen 2. Balnearios habilitados de Plottier. Fuente. Elaboración propia.

8.2 Muestreo

Para el análisis microbiológico del agua, se procedió a la toma de cuatro muestras en sitios diferentes en función del recorrido del río. La primer muestra se recolectó en el balneario viejo de Senillosa (Sitio 1), que se encuentra aguas arriba del sitio de investigación y es una zona habilitada como uso recreativo (coordenadas geográficas: S 39°1,468"; W 68°23,713"). Ver Imagen 3.

a)



b)



Imagen 3. a) y b) recolección de muestra N°1 en el Balneario viejo de Senillosa.

La segunda muestra se recolectó antes del balneario Municipal (Sitio 2), lugar establecido por el municipio de Plottier como un sector recreacional denominado paseo de la costa, (coordenadas geográficas: S 38°58,26"; W 68°14,423"). Ver Imagen 4.

a)



b)



Imagen 4. a) Sitio de muestreo N° 2, b) medición de parámetros físico químicos.

La tercer muestra se tomó en el balneario Municipal de Plottier, más conocido como “Nephén Hue”, que significa “lugar para despertarse” (coordenadas geográficas: S 38°57'57"; W 68°12'36"). Ver Imagen 5.

a)



b)



Imagen 5. a) Sitio de muestreo, b) recolección de muestra N° 3.

Por último, la cuarta muestra, fue tomada en el balneario La Herradura (coordenadas geográficas: S 38°57'31"; W 68°11'18"). Ver Imagen 6.

a)



b)



Imagen 6. a) Sitio de muestreo, b) recolección de muestra N° 4.

La toma de muestra se llevó a cabo en los meses de marzo y abril. Se procedió a la recolección de las mismas sobre la margen del río, según lo establecido en la metodología de muestreo para el recuento y aislamiento de *Enterococcus*.

Se elaboró una planilla de campo donde se registraron los parámetros físico-químicos *in situ* (ver Anexo I), con el multímetro HANNA instruments (HI9812-5) de la Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, que permite el relevamiento de, temperatura (°C), pH, sólidos disueltos (ppm) y conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), como muestra la Imagen 7.



Imagen 7. Instrumental utilizado en el muestreo.

Las muestras se recolectaron y se mantuvieron refrigeradas hasta su transporte al Laboratorio de la Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud de la Universidad Nacional del Comahue.

8.3 Análisis microbiológico

El procedimiento de análisis de las muestras se realizó acorde con la metodología de Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (American Public Health Association (APHA), American Water Works Association & Water Pollution Control Federation (WPCF), 1992), establecidos para recuento y aislamiento de *Enterococcus* en muestras de agua a través de la Técnica del Número más Probable (NMP).

8.3.1 Prueba Presuntiva

Esta constituye la primer prueba realizada a las muestras de agua, la misma se llevó a cabo inoculando tubos con medio de cultivo Azida Dextrosa, aplicando la Técnica de Número más Probable (APHA, 1992). Luego de la siembra los tubos fueron incubados en estufa de cultivo durante 24-48 hs a 35°C. Posteriormente se observó cada tubo para verificar turbidez en los mismos, resultado que fue considerado como positivo. Los valores se expresaron en NMP de *Enterococcus*/100 ml de muestra.

8.3.2 Prueba Confirmatoria

Solo los tubos que fueron positivos en la Prueba Presuntiva fueron sometidos a esta determinación, la misma se llevó a cabo inoculando tubos con medio Líquido Encéfalo Corazón Infusión, adicionando 6,5 % de CINa para la selectividad de las colonias de *Enterococcus*. Luego de la siembra los tubos se incubaron durante 24-48 hs a 35°C. Posteriormente se observó cada tubo para verificar turbidez en los mismos, resultado que fue considerado como positivo, confirmando el desarrollo de *Enterococcus*. Los valores se expresaron en NMP de *Enterococcus*/100 ml de muestra.

8.3.3 Prueba Complementaria de doble Verificación

8.3.3.1 Siembra y Aislamiento

La prueba consistió en sembrar alícuotas de cada uno de los tubos que fueron positivos en la prueba confirmatoria en placas con agar Encéfalo Corazón Infusión. Luego las mismas fueron incubadas en estufa a 35°C por 24-48 hs. Posteriormente se pudo observar el desarrollo de colonias típicas, para luego realizar los aislamientos.

Los aislamientos de colonias típicas se realizaron en tubos con agar Encéfalo Corazón Infusión en pico de flauta. Los mismos se incubaron a 35°C por 24-48 hs.

8.3.3.2 Prueba Catalasa

La prueba consistió, según las normas APHA (1992), en transferir con ansa una parte del inóculo obtenido de los aislamientos antes mencionados a dos portaobjetos limpios. Donde a uno de ellos se le adicionó unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. La aparición de burbujas constituye a una prueba catalasa positiva e indica que la colonia no pertenece al grupo *Enterococcus*.

8.3.3.3 Coloración de Gram

Si la prueba de catalasa resultó negativa, es decir no aparecen burbujas, se le realizó al segundo portaobjeto la coloración de Gram y se observó al microscopio para visualizar las cadenas cortas o pares de cocos Gram positivos, característicos de *Enterococcus* (APHA, 1992).

8.4 Análisis Físico-Químicos

Los parámetros físicos- químicos que se tomaron *in situ* fueron: pH, conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), sólidos disueltos (ppm) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$), con el multímetro de la Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud (HANNA instruments (HI9812-5)).

8.5 Caudales

Los valores de los caudales en el período de muestreo marzo – abril fueron datos aportados por la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC). El mes de marzo registró un caudal de $348,48 \text{ m}^3/\text{seg}$ y el mes de abril registró un caudal de $332,39 \text{ m}^3/\text{seg}$.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Análisis Microbiológicos

9.1.1 Prueba Presuntiva

Luego de la siembra, los tubos que fueron incubados se observó verificando turbidez en los mismos, resultado que se considera como positivo para la determinación de la presencia en agua de *Enterococcus*, como muestra la Imagen 8.

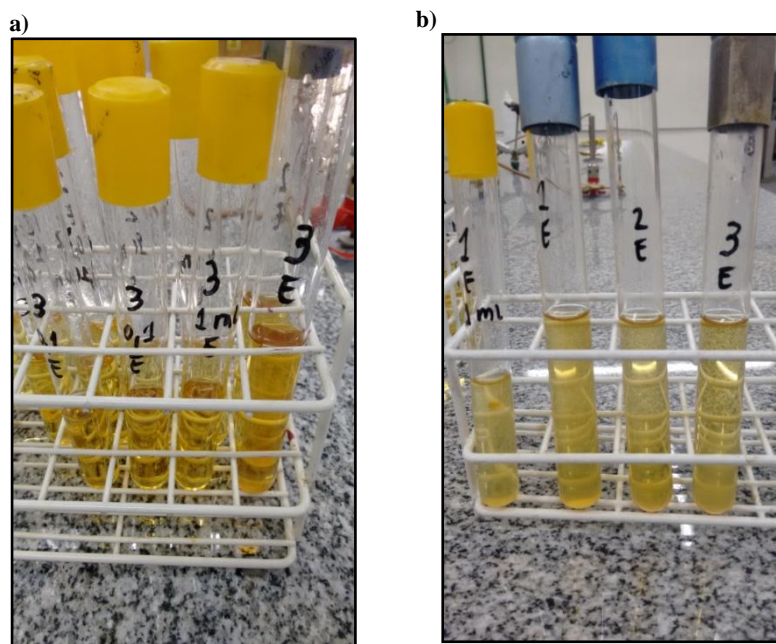


Imagen 8. a) Tubos múltiples negativos (-), b) tubos positivos (+).

El caldo Azida Dextrosa es el medio adecuado para la realización de esta prueba ya que permite el enriquecimiento selectivo de *Enterococcus* en muestras de aguas y aguas residuales, para la técnica de tubos múltiples (Rossen, 2007).

9.1.2 Prueba Confirmatoria

Los tubos que fueron positivos en la técnica presuntiva son sometidos a esta determinación. Posterior a la incubación, se observaron los tubos verificando presencia de turbidez, resultado positivo, es decir confirmación de *Enterococcus* como se muestra en la Imagen 9.

Dado que el medio es el adecuado para el crecimiento de microorganismos patógenos (Rossen, 2007).

a)



b)

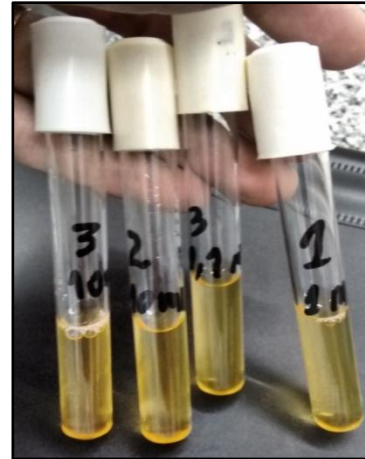


Imagen 9. Prueba confirmatoria, a) adición de CINa al 6,5%; b) tubos positivos (+), confirmación de *Enterococcus*

Los resultados obtenidos del primer y segundo muestreo de la prueba confirmatoria se muestran en la Tabla 1, los mismos surgen de la utilización de la tabla para el cálculo del Número Más Probable (ver Anexo III), teniendo en cuenta la siembra de tres tubos por dilución (10 ml, 1 ml, 0,1 ml) (APHA, 1192).

Tabla 1: Resultados de Prueba Confirmatoria.

PRIMER MUESTREO				
PRUEBA CONFIRMATORIA (NMP de <i>Enterococcus</i> /100ml)				
ENCÉFALO CORAZÓN INFUSIÓN con CINa	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
	43	35	75	210
SEGUNDO MUESTREO				
PRUEBA CONFIRMATORIA (NMP de <i>Enterococcus</i> /100 ml)				
ENCÉFALO CORAZÓN INFUSIÓN con CINa	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
	>1100	7	1100	460

Fuente. Elaboración propia.

Como se puede observar en la Tabla 1, existen diferencias entre los valores encontrados en ambos muestreos. En el caso del primer muestreo los valores encontrados en todos los sitios evidencian presencia de miembros del grupo *Enterococcus*. En el segundo muestreo, en los sitios 1, 3 y 4, se puede observar que hubo un aumento de dichas bacterias que puede ser atribuido a los bajos caudales registrados durante el mes de muestreo. Otro factor importante que podría contribuir en el crecimiento bacteriano, fueron las condiciones de temperatura del mismo mes.

Lo mencionado anteriormente coincide con lo expuesto por Malaver *et.al* (2014) y Pucciarelli *et. al* (2014), quienes destacan que los *Enterococcus* son indicadores con alta tolerancia a condiciones ambientales, en especial con los parámetros evaluados en esta investigación como el rango de temperatura (10°C - 45°C), el rango de pH (4,6 - 9,6) y la salinidad del medio que se traduce en la habilidad para crecer en presencia de alta concentraciones de sales. Dicha situación condice con los resultados obtenidos en esta investigación en los sitios de muestreos.

9.1.3 Prueba Complementaria de doble Verificación

9.1.3.1 Siembra y Aislamiento

De los tubos positivos en la etapa confirmatoria se realizó la siembra en placas con agar Encéfalo Corazón Infusión. Luego de la incubación se observaron el desarrollo de colonias típicas, como muestra la Imagen 10.

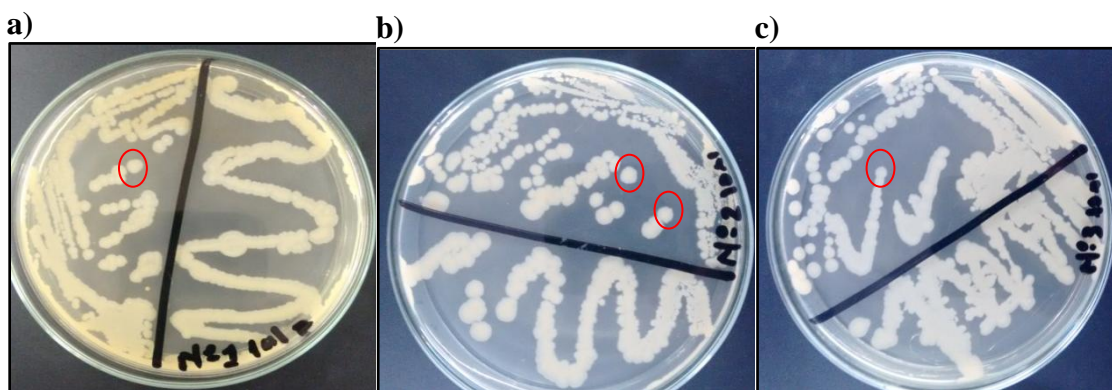


Imagen 10. a), b) y c) placas con desarrollo típico de colonias de *Enterococcus* marcadas con círculo rojo.

Para la realización de los posteriores aislamientos de colonias típicas en tubos en pico de flauta con agar Cerebro Corazón, como muestra la Imagen 11.

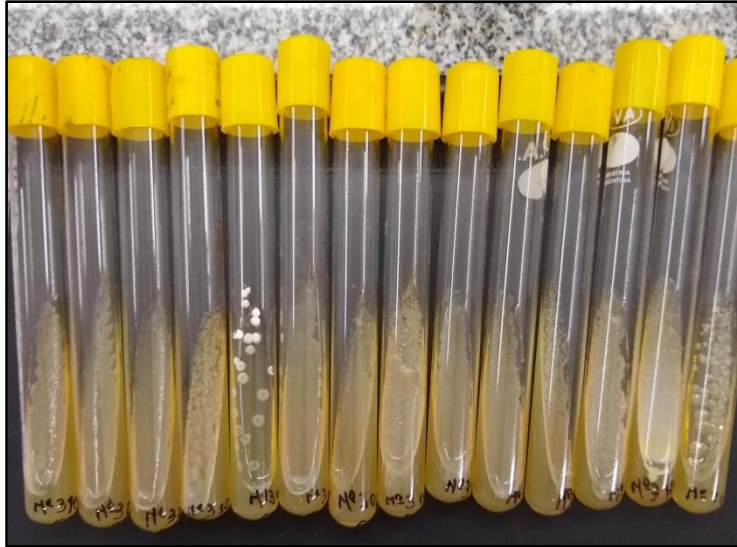


Imagen 11. Aislamientos en pico de flauta con desarrollos de *Enterococcus*.

El agar Cerebro Corazón Infusión es el más adecuado para la selección de bacterias del grupo *Enterococcus*, dado que es un medio rico en nutrientes y proporciona un adecuado desarrollo microbiano (Rossen, 2007), es por ello que es el medio elegido para el desarrollo de estos organismos en la presente investigación.

9.1.3.2 Prueba Catalasa

Luego a uno de los portaobjetos se le transfirió una parte del inóculo para agregarle peróxido de hidrógeno y poder observar la aparición de burbujas, que constituye a una prueba catalasa positiva lo cual indica que la colonia no pertenece al grupo *Enterococcus*, como se muestra en la Imagen 12.

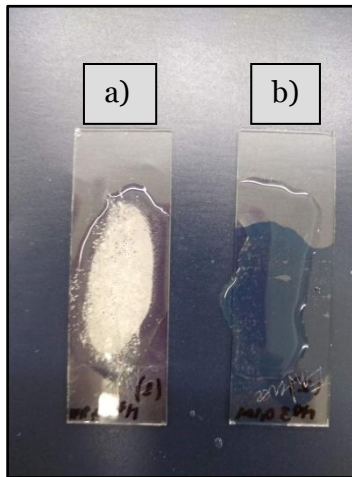


Imagen 12. En el porta objetos a) reacción positiva (+) a catalasa y en el porta objetos b) reacción negativa (-) a catalasa.

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa) (Fernández Olmos *et. al.*; 2010).

De un total de 53 aislamientos realizados, 20 (37,76%) resultaron negativos a la prueba Catalasa (ver Gráfico 1). Esto significa que dichas cepas pertenecen al grupo de los *Enterococcus* ya que no presentaron burbujas al adicionar peróxido de hidrógeno, en esta prueba. Estos resultados se consideran relevantes debido a los valores encontrados en los recuentos de los miembros del grupo *Enterococcus* que no son tenidos en cuenta en los monitoreos que realiza la Autoridad de Aplicación en la zona de estudio.

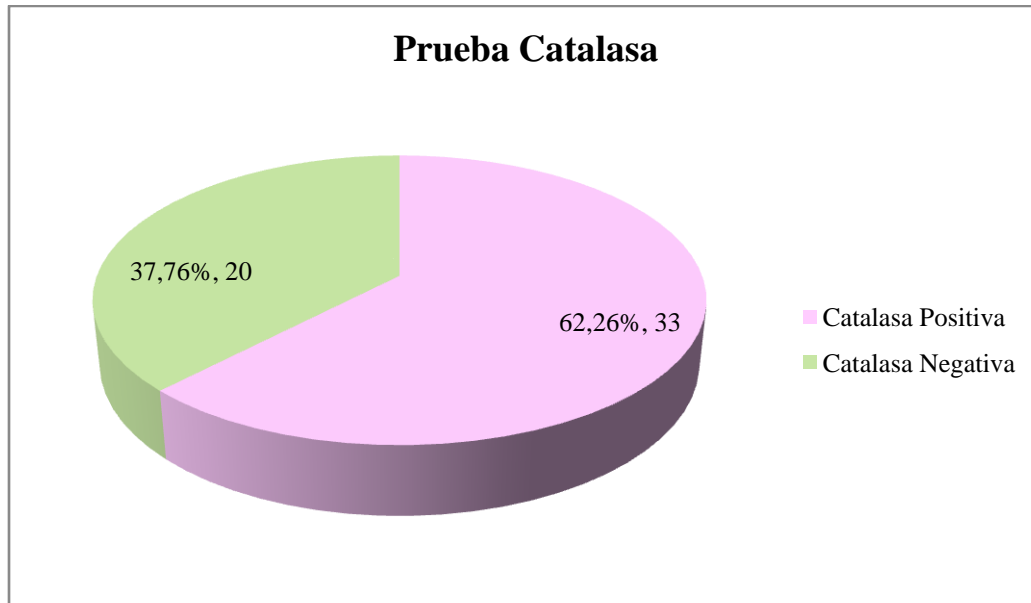


Gráfico 1. Resultado de prueba catalasa.

Para poder evaluar el estado sanitario de las aguas de uso recreativo es necesario contar con niveles basados en estudios epidemiológicos. Sin embargo, a nivel nacional no se han establecidos límites para la presencia del grupo *Enterococcus* (Nadal *et.al*, 2012).

Como la importancia en el género *Enterococcus* radica en su alta resistencia a antibióticos, como la vancomicina, en ocasiones una única alternativa de tratamientos en infecciones severas por *Enterococcus*. Se conoce que el antimicrobiano de elección en las infecciones por *Enterococcus* es ampicilina, que tiene un efecto inhibitor y no lítico. Para lograr un efecto bactericida en infecciones graves como endocarditis, bacteremias o meningitis, se recomienda asociar un aminoglucósido, siempre que la resistencia a este último sea de bajo nivel: < 500 µg/ml para gentamicina y < 2.000µg/ml para estreptomina (Larenas, 2002).

Con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y según lo expuesto por Díaz Pérez (2010), la presencia de microorganismos del grupo *Enterococcus* en el agua de uso recreacional producen enfermedades gastrointestinales, enfermedades respiratorias y febriles agudas, infecciones en la piel, etc., existen estudios donde demostraron que la sintomatología gastrointestinal asociada con la natación era mucho más predominante entre niños (10 años de edad o menores) por contar con sistemas inmunológicos menos desarrollados que entre adultos.

9.1.3.3 Coloración de Gram

Simultáneamente a la prueba Catalasa se realizaron la coloración de Gram como muestra la Imagen 13, posteriormente, se realizó la observación al microscopio como muestra la Imagen 14.



Imagen 13. Procedimiento de la coloración de Gram.

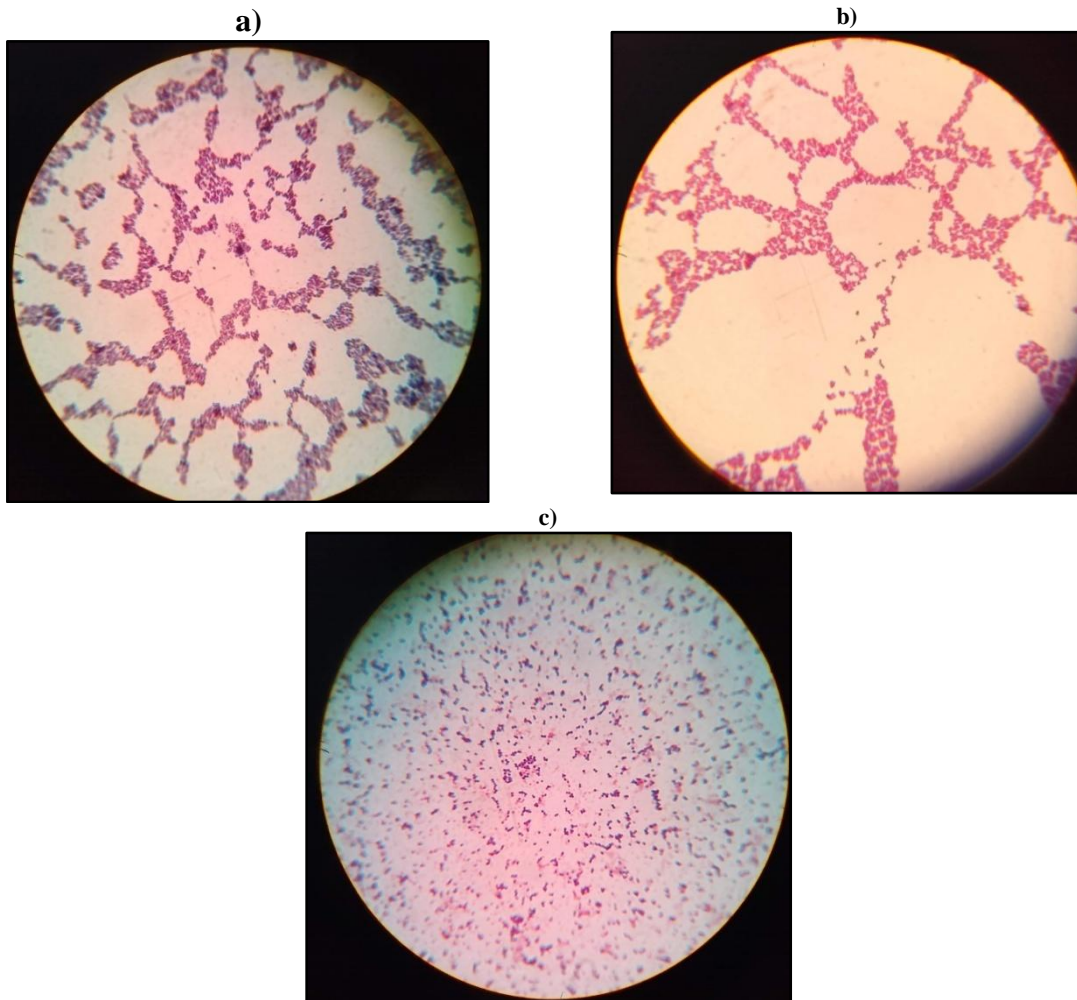


Imagen 14. a), b) y c) fotos a través de lo observado en el microscopio de *Enterococcus*.

Según Fernández Olmos (2010), la coloración de Gram es, a menudo, la primera prueba de confirmación que nos permite hacer un diagnóstico previo a los proceso de identificación de las cepas bacterianas, atendiendo a los tipos de muestras que se analizan.

A través del uso del microscopio, los miembros del grupo *Enterococcus* pueden observarse como células esféricas u ovoides de 0,6-1,0 μm de diámetro que se agrupan en pares o cadenas de longitud variable como muestra la Imagen 15. En cuanto a sus características morfológicas y fisiológicas, estas bacterias son Gram positivas, inmóviles, no formadoras de esporos, catalasas negativas y anaerobias facultativas (Rodríguez *et al*, 2015).

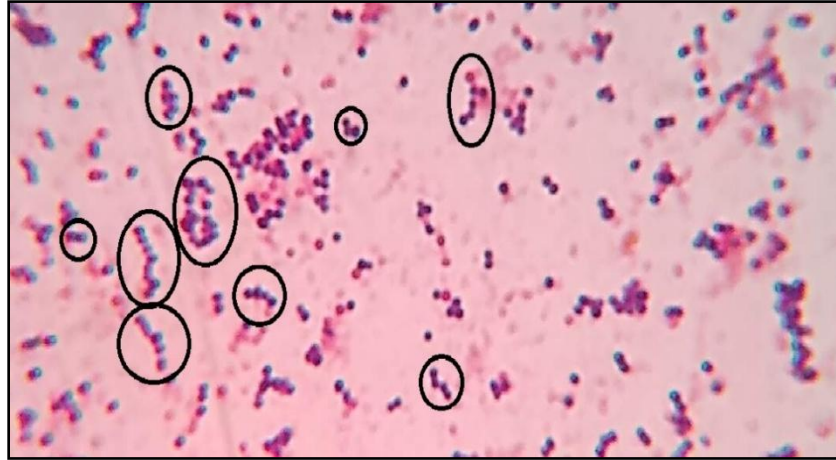


Imagen 15. Visualización de cadenas cortas o pares de *Enterococcus* marcadas con círculo negro.

9.2 Análisis Físico-Químicos

Los parámetros relevados *in situ* como temperatura (°C), pH, conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y sólidos disueltos (ppm) son importantes de ser evaluados ya que permiten entender en qué condiciones ambientales se desarrollan las bacterias.

En este estudio se pudo observar la variabilidad de los parámetros tomados *in situ*. La temperatura registró fluctuaciones en los meses de muestreo lo que puede ser atribuido a los diferentes momentos del día en que se realizó la toma de muestra. En el mes de marzo se realizó durante la mañana y en el mes de abril durante la tarde (ver Gráfico 2) resultado que influye en la actividad de los microorganismos, debido que la temperatura del agua es directamente proporcional a la ambiental y la variación en las condiciones ambientales puede afectar la supervivencia de los mismos (Malaver *et. al.*, 2014).

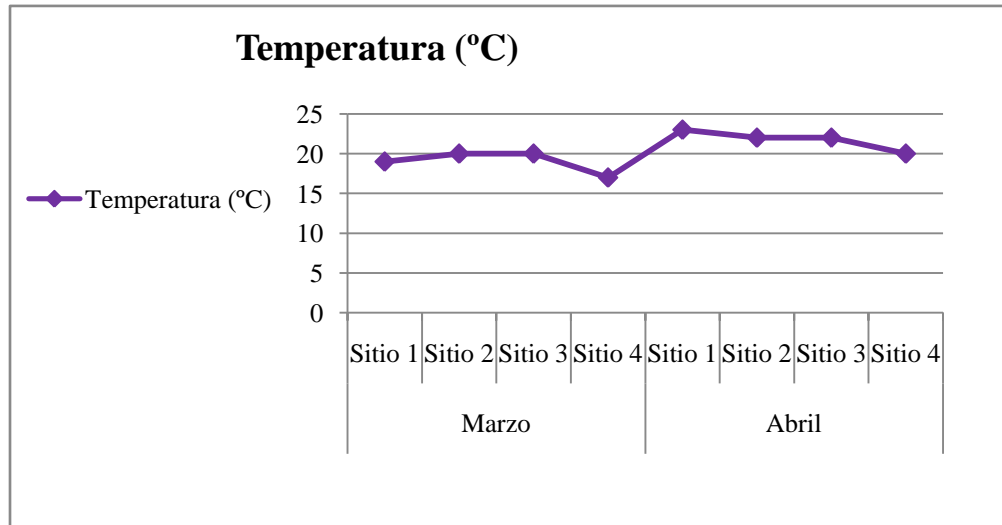


Gráfico 2. Período Marzo – Abril. Fuente. Elaboración propia.

En cuanto al pH se observó una variabilidad entre 5 y 6,5 durante los meses de marzo y abril, siendo este último el más cercano a la neutralidad (ver Gráfico 3). Este parámetro es importante dado que el grupo *Enterococcus* se desarrolla en un rango de pH que va de 4,6 a 10. Según Malaver *et. al* (2014) un pH menor a 7 puede estar relacionado con la descomposición de la materia orgánica, la cual libera ácidos; o bien a la presencia de CO₂.

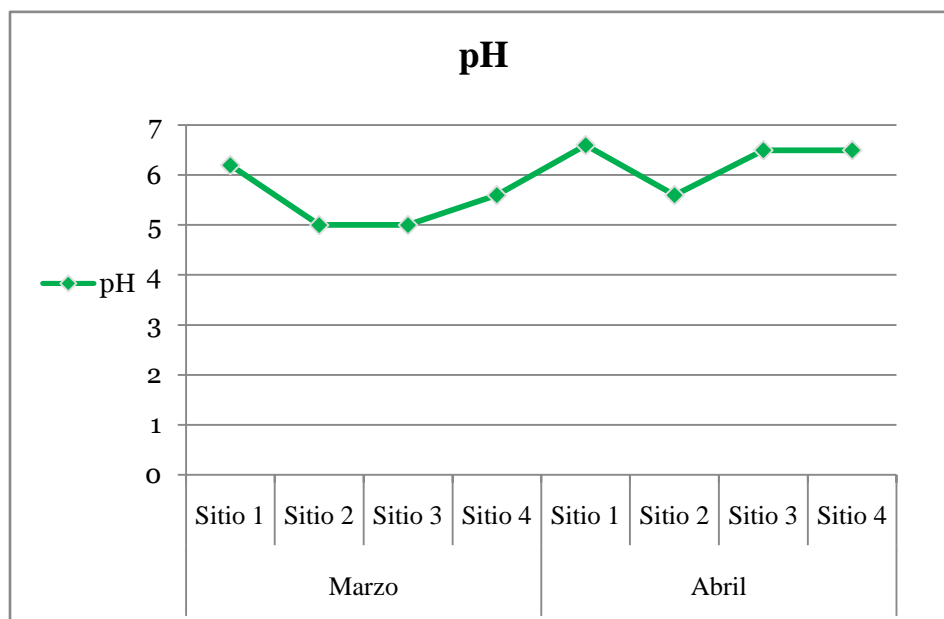


Gráfico 3. Período Marzo – Abril. Fuente. Elaboración propia.

La conductividad muestra una variación en el mes de marzo, pero en el mes de abril se mantuvo constante (ver Gráfico 4). Esto puede deberse a las descargas de aguas residuales en diferentes sitios del río.

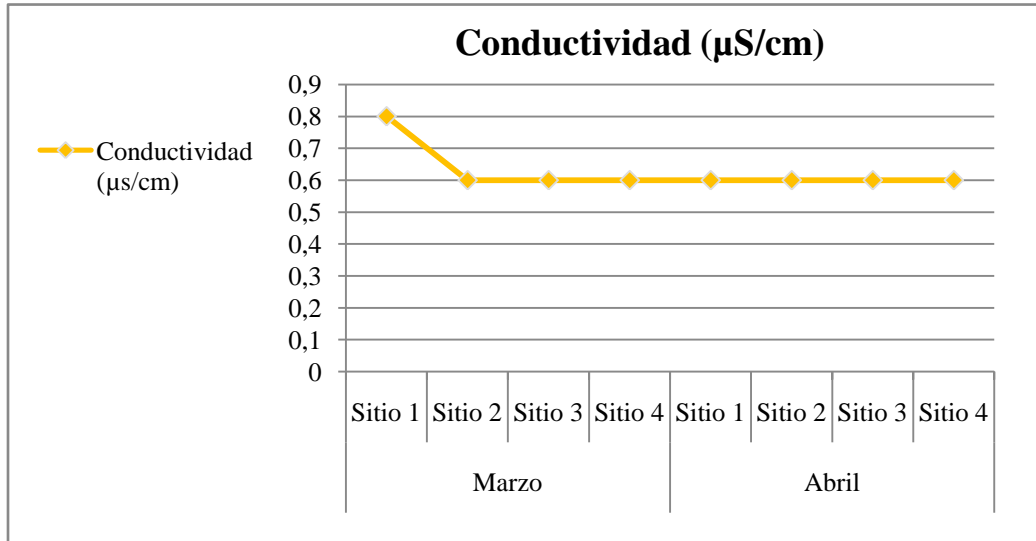


Gráfico 4. Período Marzo – Abril. Fuente. Elaboración propia.

Los sólidos disueltos no muestran una gran variabilidad en el mes de marzo y abril, esto se debe a la velocidad de la corriente del río y al caudal del mismo (ver Gráfico 5). Como los sólidos disueltos son importantes, dado que altas concentraciones de los mismos pueden provocar una reducción en la incidencia de la luz solar afectando en la actividad microbiana.

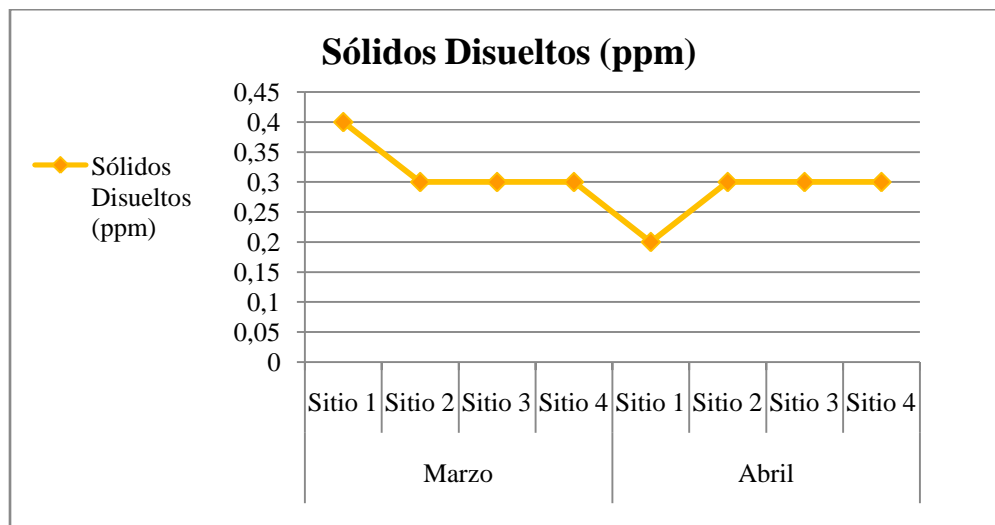


Gráfico 5. Período Marzo- Abril. Fuente. Elaboración propia.

9.3 Caudales

Como se puede observar en los Gráfico 6 y 7, el caudal medido por la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC) en los meses de muestreo reflejan variabilidad, siendo menor durante el mes de abril; condición que concuerda con los valores de *Enterococcus* obtenidos en esta investigación.

La relación entre caudal y recuento de *Enterococcus* se muestran en el Gráfico 8, en el cual se observa que en los sitios 1, 3 y 4 (para el segundo muestreo) existe un incremento en los valores encontrados de bacterias del miembro del grupo *Enterococcus*, superando ampliamente el valor guía establecido por PNUMA y OMS de 33 colonias de *Enterococcus*/100 ml, niveles guías internacionales con los que se compara mientras en Argentina se elabore una normativa propia pertinente a aguas recreativas.

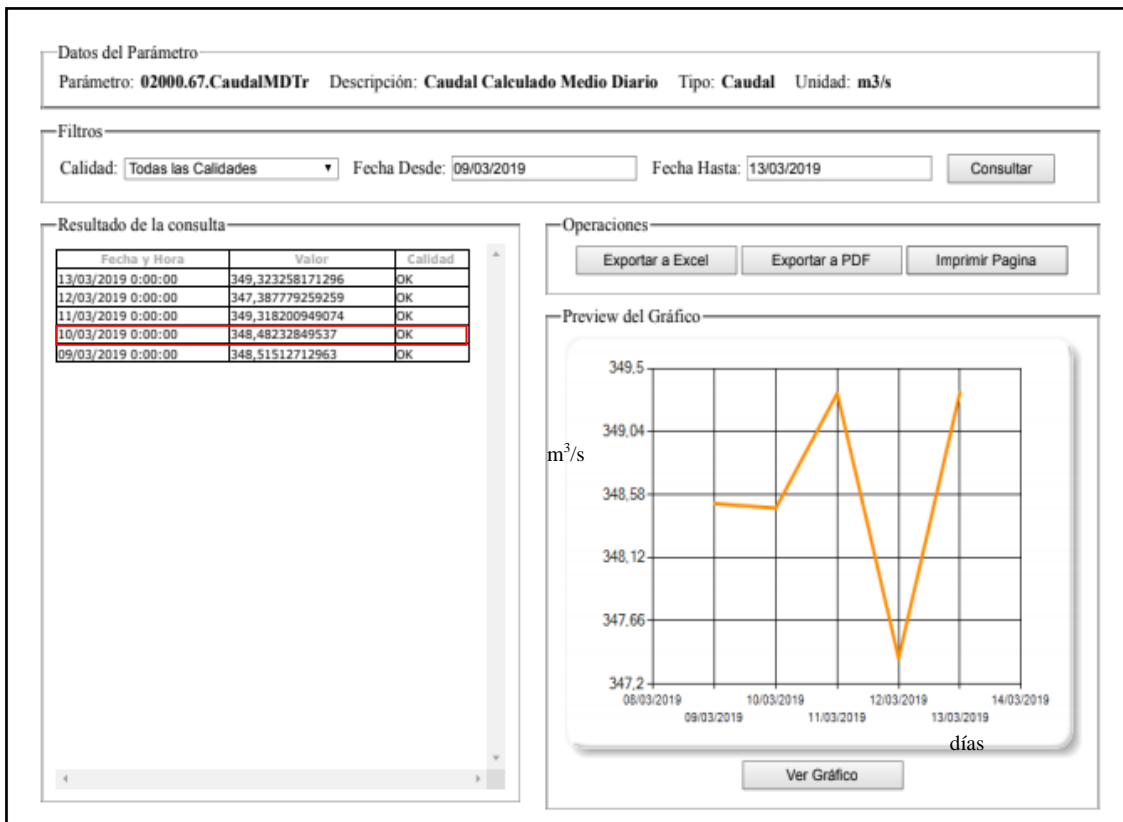


Gráfico 6. Datos aportados por al AIC, en función a caudales; en el recuadro color rojo se marca el caudal del día del muestreo. Fuente AIC.

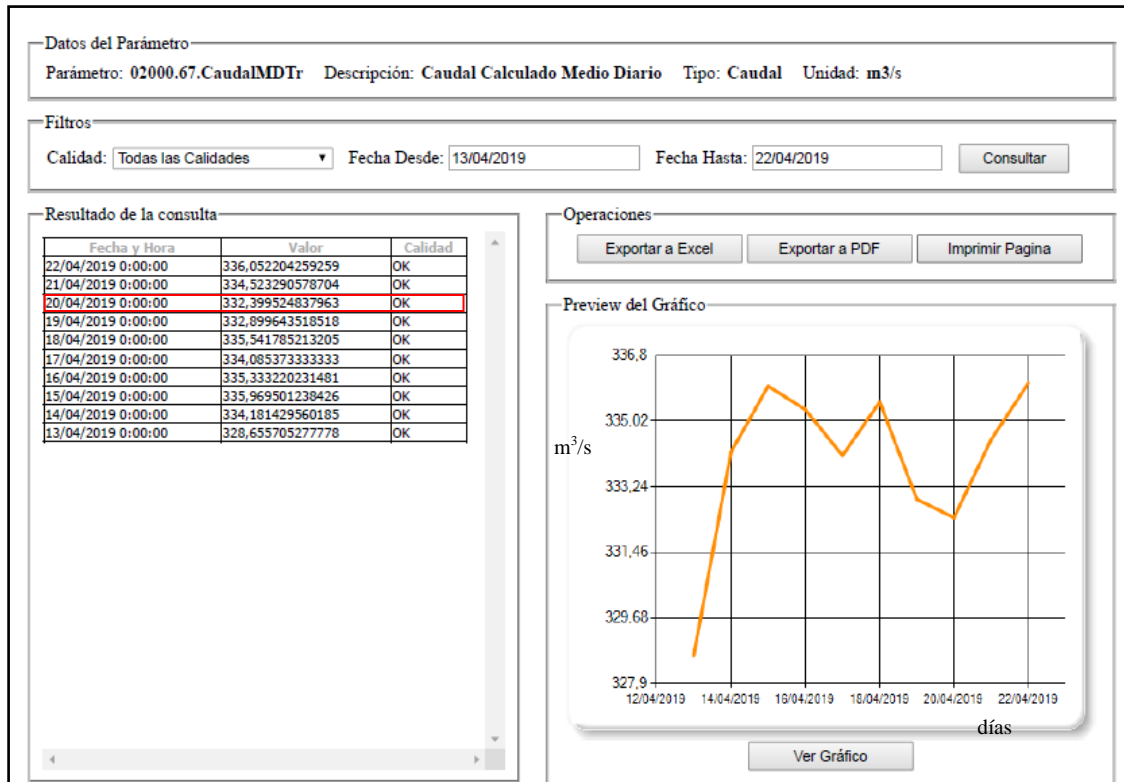


Gráfico 7. Datos aportados por la AIC, en función de los caudales; en el recuadro de color rojo se marca el caudal del día del muestreo. Fuente AIC.

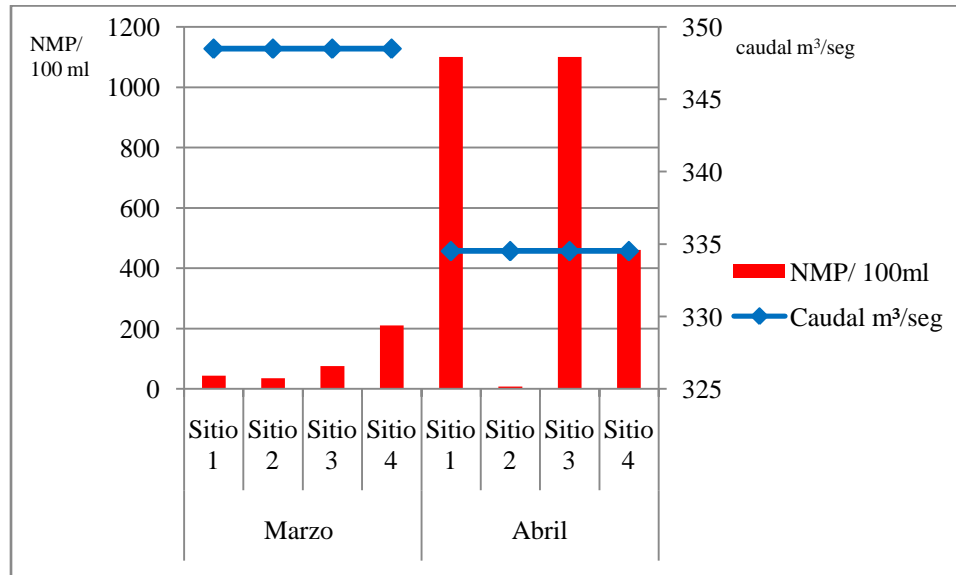


Gráfico 8. Variación espacial y temporal de *Enterococcus* en los diferentes sitios de muestreo. Fuente. Elaboración propia.

La Organización Mundial de la Salud plantea que los *Enterococcus* fecales son considerados de gran valor para medir la eficiencia de los tratamientos del agua potable, para los controles corrientes después de la inserción de nuevos conductos, o cuando se reparan los sistemas de distribución (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

Existe gran cantidad de reportes que consideran a las especies del genero *Enterococcus* como uno de los principales patógenos nosocomiales al nivel mundial. Estos microorganismos pueden ocasionar gran cantidad de enfermedades que pueden incluso ocasionar la muerte; es por ello que resulta de notable su detección temprana, el reporte de los aislamientos, así como el seguimiento de cerca de su perfil de resistencia antimicrobiana (Díaz Pérez *et.al*, 2010).

Dado que las enfermedades gastrointestinales originadas por aguas recreativas poseen una buena correlación con la densidad de *Escherichia coli* y el grupo *Enterococcus* presentes en agua dulce, es conveniente que se hagan estudios en conjunto para tener una buena estimación de la calidad sanitaria (Nadal *et.al*, 2010).

10. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Los datos obtenidos en el presente trabajo de tesis, evidencian la presencia de miembros del grupo *Enterococcus* en los sitios de muestreo analizados en aguas del río Limay. De las pruebas de identificación y confirmación se concluye que el medio utilizado es el adecuado para el crecimiento de microorganismos del miembro el grupo *Enterococcus*. En el primer y segundo muestreo se evidenció la presencia de las bacterias, siendo mayor en el segundo muestreo, el aumento de dichas bacterias puede estar atribuido a los bajos caudales registrados en el mes durante el muestreo. Otro factor que podría contribuir en el crecimiento bacteriano, fueron las condiciones de temperatura del mismo mes. Se puede concluir que de la siembra y de los aislamientos el agar utilizado es el más adecuado para el desarrollo microbiano. De la prueba Catalasa se concluye que de un total de 53 aislamientos, 20 (37,76%) resultaron negativos a dicha prueba. Esto significa que dichas cepas pertenecen al grupo de *Enterococcus* ya que no presentaron burbujas al adicionar peróxido de hidrógeno. Estos resultados se consideran relevantes debido a que no se realizan determinaciones del grupo *Enterococcus* en los monitoreos que realiza la Autoridad de Aplicación en la zona de estudio. La coloración de Gram permitió hacer un diagnóstico previo al proceso de identificación de las cepas bacterianas en el microscopio. A través del microscopio se pudo observar las células esféricas u ovoides que se agrupan en pares o cadenas de longitud variable.

En este estudio se pudo observar la variabilidad de los parámetros tomados *in situ*, la temperatura registró fluctuaciones en los meses de muestreo, resultado que influye en la actividad de los microorganismos. El pH registró variaciones en los meses muestreados, dato importante dado que el grupo de *Enterococcus* se desarrolla en un rango de pH que va de 4,6 a 10. La conductividad también registró variaciones en el mes de marzo, pero en el mes de abril se mantuvo constante, esto puede deberse a las descargas de aguas residuales en los diferentes sitios del río. Los sólidos disueltos no mostraron una gran variabilidad en los meses de muestreo, esto pudo deberse a la corriente del río y al caudal del mismo.

El hecho de encontrar bacterias pertenecientes al grupo de *Enterococcus* tiene correlación con su capacidad de sobrevivir en el ambiente. En este sentido, es importante

considerar que la variabilidad en las condiciones ambientales puede afectar en distinto grado la supervivencia de los grupos bacterianos, de forma que utilizar un solo grupo como indicador de contaminación fecal no permitiría tener una buena estimación de la calidad sanitaria. Por tal motivo, se considera que la determinación de *Enterococcus* fecales en combinación con los coliformes, que se encuentran más relacionados al foco de emisión, permite tener una mejor evaluación de la contaminación fecal y su difusión en el ambiente.

Cabe destacar la importancia de comenzar con monitoreos de concentración de bacterias del grupo *Enterococcus*, ya que en este estudio se encontraron valores de colonias superiores a los límites establecidos por el PNUMA y la OMS, mientras se elabore en Argentina una normativa propia pertinente a aguas recreativas.

De esta manera, un análisis más detallado de los indicadores de contaminación fecal nos permitiría llevar un control más exhaustivo de las enfermedades gastrointestinales de la población, a nivel local como a nivel nacional. Cabe mencionar además que hay que tener en cuenta que los lugares en el río que los vecinos buscan para usar de forma recreativa en la época de verano muchas veces no están habilitados como balneario.

Por otro lado, la importancia de comenzar con los monitoreos e incorporar al análisis microbiológico, el análisis del grupo *Enterococcus* se debe porque sobre la margen del río en el balneario de Plottier se encuentran dos tomas de aguas. Donde una toma de agua es de la Planta de agua potable y la otra toma de agua es para los camiones regadores con la cual se riegan las calles de ripio en la ciudad de Plottier y esto puede provocar contaminación en el suelo, siendo este un foco de emisión.

En conclusión por lo expuesto anteriormente, el grupo *Enterococcus* está presente en el río Limay, en los balnearios utilizados en forma recreativa por los vecinos de Plottier y Senillosa, afectando la calidad sanitaria, a la salud de las personas y al ambiente.

Las recomendaciones propuestas son:

- Utilizar este trabajo de tesis como punto de partida para futuras investigaciones.
- Proponer la implementación de un protocolo al interior de los hospitales y los centros de Salud barriales que permitan identificar la presencia de miembros del grupo de *Enterococcus* en pacientes que hayan tenido contacto primario con aguas recreacionales.
- La elaboración de los protocolos anteriormente mencionados podrán establecer un seguimiento de las enfermedades provocadas por el grupo *Enterococcus* en los hospitales de la provincia de Neuquén, que permitirá a la Autoridad de Aplicación establecer muestreos periódicos y definir sitios de afectación para su seguimiento.
- La incorporación del grupo *Enterococcus* en los análisis microbiológicos que realiza la Autoridad de Aplicación para evaluar la calidad sanitaria del río Limay en la ciudad de Neuquén.
- Promover, a partir de los resultados de esta investigación, la elaboración de normativa local que permita incluir el estudio de indicadores del grupo *Enterococcus* en conjunto con otros indicadores.

11. BIBLIOGRAFÍA

American Public Health Association (APHA) (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales*. Madrid, España. Editorial Díaz de Santos.

Alarcón Lopéz, P. “Vigilancia de *Enterococcus spp*, resistente a Vancomicina Chile 2010-2012”. Boletín, Instituto de Salud Pública de Chile, vol 3, N° 10. Septiembre 2013.

Díaz Pérez, M, Rodríguez Martínez, C, & Zhurbenko, R, (2010). *Aspectos Fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad*. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48(2) ,147-161.

Fernández Olmos A, García de la Fuente C, Saéz Nieto J, Valdezate Ramos S. “*Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*” (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Gómez C,L., (2017). Tesis de grado: “*Evaluación de la calidad ambiental del agua de los Balnearios habilitados del rio Limay, a través de la presencia del grupo Enterococcus*”. Universidad Nacional del Comahue.

López Sardi, E, M; Gracia, B, Reynoso, Y; Gonzales, P; Larroude, V, (2016). “*Calidad del agua para usos recreativos desde las perspectivas de la seguridad e higiene laboral y salud pública*”. Estudio de caso. Junio, 2016.

Madigan, M. T, Martinko, G. M., Parker, J., 2004. “*Brock, Biología de los microorganismos*”. 10^a ed. Editorial Prentice Hall INC.

Malaver N, Rodríguez M, Montero R, Aguilar V. “*Uso de bioindicadores de contaminación para determinar la calidad del agua en el parque nacional laguna de Tacarigua. Consideraciones espacio- temporales*”. 1Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET).UCV 2Instituto de Ciencias de la Tierra (ICT). UCV 3Instituto de Geografía y Desarrollo Regional. UCV. Venezuela 2014.

Martínez, S. (2009). “*Cuenca del Río Limay*”. Ministerio del interior obras públicas. <https://www.mininterior.gov.ar/obras-publicas/pdf/63.pdf>

Ministerio de Medio Ambiente. Secretaria de Estado de Aguas y Costas. Dirección de Obras Hidráulicas y Calidad de las Aguas. “*Libro Blanco del agua en España*”. España 2000.

Nadal, F., Ruiz M, Rodríguez M. I., Halac, S., & Olivera, P, 2012. “*Evaluación de la calidad de agua para uso recreativo del embalse San Roque, Córdoba, Argentina*”.

Larenas Chrystal J, 2002. “*Estudio de susceptibilidad in vitro de Enterococcus spp.*” Laboratorio de Microbiología. Hospital del Salvador.

Pinilla Campos, C., (2001). “*Indicadores de Contaminación fecal en aguas*”. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua RIPDA CYTED (Ciencia y tecnología para el Desarrollo).

Pezzullo, S, D., (2007). Tesis de grado. *Persistencia de Microorganismos Coliformes en suelos urbanos con contaminación antrópica discontinua*. Neuquén Capital, Universidad Nacional del Comahue, Escuela Superior de Salud y Ambiente.

Programa de Control de Aguas de Río Negro (DPA). Programa: Control Bacteriológico de Balneario. “*Determinación de la Aptitud del Agua para Uso Recreativo con contacto Directo*”. Viedma (Río Negro) 2016.

Pucciarelli, A. B., Tessari, A., & von Specht, M. H. (2014). “*Enterococcus en aguas del arroyo Vicario: recuento, identificación y perfil de sensibilidad*”. Revista de Ciencia y Tecnología, (21), 20-26. Posadas, Misiones.

Rossen, A., Rodriguez, M., Rulbal Conti, A., Fortunato, M., Buatamante, A., Ruiz, M., Melero, V., Angelaccio, C., Korol, S. “*Evaluación del estado sanitario del Lago San Roque (Córdoba) empleando indicadores microbiológicos*”. XXI Congreso Nacional del Agua 2007, Tucumán, 15 al 19 de Mayo de 2007.

Rodríguez, G et. al (2015). “*Géneros Streptococcus y Enterococcus*”, pag 273.

Ugolini, F. (2006). Tesis de grado. “*Estudio Bacteriológico de aguas Recreacionales de balnearios del río Limay en la ciudad del Neuquén*”. Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud. Universidad Nacional del Comahue.

ANEXOS

12.1 Anexo I: Tabla con datos de muestreo *in situ***Tabla 2: Datos de campo primer muestreo de marzo.**

DATOS DEL PRIMER MUESTREO MARZO 2019				
Sitios	BALNEARIO VIEJO DE SENILLOSA	ANTES DEL BALNEARIO PLOTTIER	BALNEARIO PLOTTIER	HERRADURA
Día del muestreo	10/03	10/03	10/03	11/03
coordenadas	(S) 39°1,468´ (O)68°23,713´	(S) 38°58´37´´ (O)68°14´26´´	(S) 38°57´47´´ (O)68°12´55´´	(S) 38°58,098´ (O)68°11,004´
hr	10:02 am	11:28am	12:10am	9:00 am
Temperatura (°C)	17 °C	19°C	19°C	19°C
pH	6,2	5	5	5,6
Conductividad (µs/cm)	0,8	0,6	0,6	0,6
Sólidos disueltos (ppm)	0,4	0,3	0,3	0,3
Descripción del tiempo	17 °C, soleado	20°C, soleado	20°C, soleado	17°C soleado

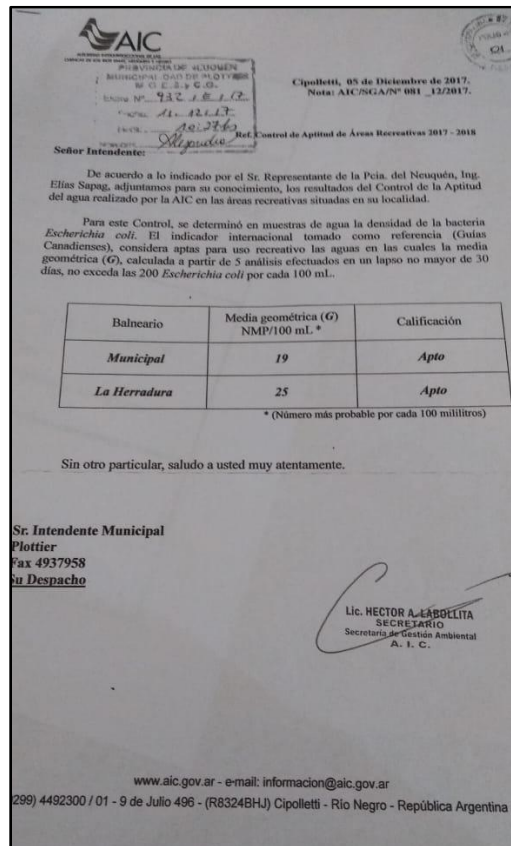
Fuente. Elaboración propia.

Tabla 3: Datos de campo del segundo muestreo de abril.

DATOS DEL SEGUNDO MUESTREO ABRIL 2019				
Sitios	BALNEARIO VIEJO DE SENILLOSA	ANTES DEL BALNEARIO PLOTTIER	BALNEARIO PLOTTIER	HERRADURA
Día del muestreo	20/04	20/04	20/04	20/04
coordenadas	(S) 39°1,468´ (O)68°23,713´	(S) 38°58´37´´ (O)68°14´26´´	(S) 38°57´47´´ (O)68°12´55´´	(S) 38°58,098´ (O)68°11,004´
hr	16:37 pm	17:30pm	18:00pm	18:30 pm
Temperatura (°C)	17 °C	19°C	19°C	19°C
pH	6,6	5	5	5,6
Conductividad (µs/cm)	0,6	0,6	0,6	0,6
Sólidos disueltos (ppm)	0,2	0,3	0,3	0,3
Descripción del tiempo	23 °C, soleado	22°C, soleado	22°C, soleado	22°C soleado

Fuente. Elaboración propia.

12.2 Anexo II: Datos de control de calidad de la aptitud del agua en áreas recreativas situadas en la localidad de Plottier.



AIC
 PROTECCIÓN DE ALIMENTOS
 MUNICIPALIDAD DE CIPOLETTI
 B.O. S. S. S. C. G. O.
 ENTIDAD Nº. 932 J. E. I. P.
 CIPOLLETTI, 05 de Diciembre de 2017.
 Nota: AIC/SGA/Nº 081_12/2017.

Ref: Control de Aptitud de Áreas Recreativas 2017 - 2018

Señor Intendente:

De acuerdo a lo indicado por el Sr. Representante de la Peña del Neuquén, Ing. Elias Sapag, adjuntamos para su conocimiento, los resultados del Control de la Aptitud del agua realizado por la AIC en las áreas recreativas situadas en su localidad.

Para este Control, se determinó en muestras de agua la densidad de la bacteria *Escherichia coli*. El indicador internacional tomado como referencia (Guías Canadienses), considera aptas para uso recreativo las aguas en las cuales la media geométrica (G), calculada a partir de 5 análisis efectuados en un lapso no mayor de 30 días, no exceda las 200 *Escherichia coli* por cada 100 mL.

Balneario	Media geométrica (G) NMP/100 mL.*	Calificación
Municipal	19	Apto
La Herradura	25	Apto

* (Número más probable por cada 100 mililitros)

Sin otro particular, saludo a usted muy atentamente.

Sr. Intendente Municipal
 Plottier
 Fax 4937958
 Su Despacho

Lic. HECTOR A. LABOLITA
 SECRETARIO
 Secretaría de Gestión Ambiental
 A. I. C.

www.aic.gov.ar - e-mail: informacion@aic.gov.ar
 299) 4492300 / 01 - 9 de Julio 496 - (R8324BHJ) Cipolletti - Rto Negro - República Argentina

Imagen 16. Parámetros que se utilizan para evaluar la calidad en las zonas recreativas en la Localidad de Plottier. Fuente proporcionada por Marcos García gerente de EDEP (Ente de Desarrollo Económico Plottier).

12.3 Anexo III: Tabla del Número Más Probable

En la siguiente tabla se muestra el Número Más Probable (NMP) con las diferentes combinaciones de las tres diluciones (0,1 ml; 1ml y 10 ml), según las normas APHA, 1192.

Tabla 4: Índice de NMP, para distintas combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan 3 tubos por dilución (A: 10ml; B: 1 ml; C: 01,1 ml).

Combinación de tubos positivos A- B- C	Índice NMP/100ml	Combinación de tubos positivos A-B- C	Índice NMP/100ml	Combinación de tubos positivos A-B- C	Índice NMP/100ml
0-0-1	3	1-1-2	15	2-2-3	42
0-0-2	6	1-1-3	19	2-3-0	29
0-0-3	9	1-2-0	11	2-3-1	36
0-1-0	3	1-2-1	15	2-3-2	44
0-1-1	6	1-2-2	20	2-3-3	53
0-1-2	9	1-2-3	24	3-0-0	23
0-1-3	12	1-3-0	16	3-0-1	39
0-2-0	6	1-3-1	20	3-0-2	64
0-2-1	9	1-3-2	24	3-0-3	95
0-2-2	12	1-3-3	29	3-1-0	43
0-2-3	16	2-0-0	9	3-1-1	75
0-3-0	9	2-0-1	14	3-1-2	120
0-3-1	13	2-0-2	20	3-1-3	160
0-3-2	16	2-0-3	28	3-2-0	93
0-3-3	19	2-1-0	15	3-2-1	150
1-0-0	4	2-1-1	20	3-2-2	210
1-0-1	7	2-1-2	27	3-2-3	290
1-0-2	11	2-1-3	34	3-3-0	240
1-0-3	15	2-2-0	21	3-3-1	460
1-1-0	7	2-2-1	28	3-3-2	1100
1-1-1	11	2-2-2	35	3-3-3	>1100