

MONITOREO DE PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS E INVESTIGACION DE BACTERIAS ANAEROBIAS SULFITO-REDUCTORAS DEL RÍO CTALAMOCHITA, CÓRDOBA, ARGENTINA.

Moyano Silvia, Marín Graciela; Bellotti Camila, Huerta Sofia, Tavella Florencia.

Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Villa María.
Av. Universidad 450 – Villa María, Córdoba - Argentina 0353-4537500.
gramarin@hotmail.com; camibellotti@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio es realizar el monitoreo de la calidad microbiológica del Río Ctalamochita, como seguimiento de la contaminación incorporada en su paso por Villa María, Córdoba, Argentina. Para ello se realiza el muestreo del río en tres puntos situados aguas arriba, en la zona central del tramo y aguas abajo de la ciudad. Se determina la presencia de indicadores de contaminación microbiológica según las Normas Para La Protección De Los Recursos Hídricos Superficiales Y Subterráneos de la Provincia de Córdoba. Se realiza la búsqueda de coliformes totales, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*. Para completar el monitoreo, se agrega el análisis de anaerobios sulfito-reductores (cepa de *Clostridium perfringens*) debido a que, por su característica de resistencia, es un buen indicador de contaminación fecal superior al grupo coliforme. Las muestras se recolectan y se analizan según los métodos establecidos por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, la Comunidad Económica Europea y la ICMSF. Se utiliza la técnica de tubos múltiples para determinar Coliformes totales, realizando la confirmación para coliformes termotolerantes y *E. coli*, a partir de los tubos positivos. En el caso de *C. perfringens*, se aplica el método de filtración por membrana y para el ensayo de anaerobios sulfito-reductores se siembra en agar TSC (Triptosa. Sulfito cicloserina). Según los muestreos realizados en el tramo en estudio del Río Ctalamochita, se detecta un deterioro de su calidad bacteriológica debida a la contaminación antropogénica, aunque se encuentra dentro de los parámetros definidos para aguas recreacionales según el Ministerio de Salud de la Nación y por lo tanto no representa un riesgo para la población. En relación a la determinación de *C. perfringens* y anaerobios sulfito reductores, las muestras analizadas fueron positivas, por lo que podrían ser utilizados como indicador complementario de la calidad sanitaria del agua superficial.

Palabras claves: monitoreo; parámetros microbiológicos; Río Tercero o Ctalamochita.

ABSTRACT

The objective of this study is to monitor the microbiological quality of the Ctalamochita river, as a follow-up of the contamination incorporated in its passage through Villa María, Córdoba, Argentina. To do this, the river is sampled at three points located upstream, in the central zone of the section and downstream of the city. The presence of indicators of microbiological contamination is determined according to the Norms for the Protection of the Surface and Underground Water Resources of the Province of Córdoba. The search for total coliforms, thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* is carried out. To complete the monitoring, the analysis of sulfite-reducing anaerobes (*Clostridium perfringens* strain) is added because, due to its resistance characteristic, it is a good indicator of fecal contamination superior to the coliform group. The samples are collected and analyzed according to the methods established by the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, the European Economic Community and the ICMSF. The multi-tube technique is used to determine total coliforms, confirming for thermotolerant coliforms and *E. coli*, from the positive tubes. In the case of *C. perfringens*, the membrane filtration method is applied and for the sulfite-reducing anaerobic test, TSC agar (Triptosa, Sulfite cycloserine) is sown. According to the samples taken in the section under study of the Ctalamochita river, a deterioration of its bacteriological quality due to anthropogenic contamination is detected, although it is within the parameters defined for recreational waters according to the Ministry

of Health of the Nation and therefore it does not represent a risk for the population. In relation to the determination of *C. perfringens* and reducing sulfite anaerobes, the samples analyzed were positive, so they could be used as a complementary indicator of the sanitary quality of surface water.

Keywords: monitoring; microbiological parameters; Third River or Ctalamochita.

INTRODUCCION

La degradación de las fuentes de agua dulce como consecuencia de las actividades antrópicas, se inicia con los asentamientos y se agrava con el crecimiento de las poblaciones y la intensificación industrial y productiva (Cossavella, et. Al, 2014).

En la evaluación de dicha afectación antrópica sobre la calidad, se efectúan determinaciones microbiológicas que representan el estado del curso de agua en el tramo en estudio. Existe un consenso general sobre la dificultad de determinar la presencia de todos los organismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental debido a que dicha determinación implica varios días de análisis, costos elevados y laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con organismos indicadores (Campos, 1999).

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar. Una vez que se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador (Campos, et. al., 1999).

En el presente trabajo se realiza un monitoreo de los parámetros indicadores microbiológicos tradicionales de agua de río (coliformes totales, termotolerantes y *Escherichia coli*) con el objetivo de determinar si existe variación de la calidad del río Ctalamochita, debido a su paso por la ciudad de Villa María. Además se realiza una investigación sobre la presencia de bacterias anaerobias sulfito reductoras, específicamente de *Clostridium perfringens* y anaerobios sulfito reductores.

El grupo coliforme está formado por todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas y con bastón, que fermentan la lactosa produciendo gas y ácido en 48 horas a 35°C. Por otro lado, los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo bacteriano asociado al género *Clostridium*. Se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas que tienen la propiedad de reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia del citrato férrico u otra sal de metales pesados, formando colonias negras características. La especie *C. perfringens* pertenece al grupo de microorganismos utilizados como indicador microbiológico de la contaminación del agua. La ventaja más importante de este grupo es que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliforme y son resistentes a la desinfección, al punto que pueden ser detectados en algunas muestras de agua después de haber recibido pre desinfección, floculación, sedimentación, filtración y la desinfección terminal (MAA y SP a, 2016; Gesche et al.2003).

METODOLOGÍA Y TECNICAS APLICADAS.

Se realizan cinco muestreos entre octubre del 2017 y septiembre del 2018, situados en tres puntos de su paso por la ciudad, con el fin de evaluar si existe una modificación de las condiciones iniciales de calidad bacteriológica en el tramo en estudio.

Se observa en la figura 1, que el primer punto de muestreo se ubica en el ingreso de la ciudad de Villa María, (A) zona denominada "Puente Andino" (Latitud: 32°25'2.91"S,

Longitud: 63°18'16.30"O). El segundo punto de muestreo (B), se ubica en la parte media del curso del Río, "Bajada de calle Entre Ríos" (Latitud: 32°25'15.79"S, Longitud: 63°15'15.55"O). En la (C) se ubica el tercer punto de muestreo hacia la salida de la ciudad en el acceso al barrio "Barrancas del Río" (Latitud: 32°25'50.85"S, Longitud: 63°13'23.31"O).



Figura 1: Sitios de muestreo: A-Puente Andino; B- Bajada de calle Entre Ríos; C-Barrio Barrancas del Río

La figura 2 ilustra las características de los puntos de muestreo elegidos para llevar a cabo la evaluación de calidad, donde predominan amplios bancos de arena.



Figura 2: Puntos de muestreo (A) Puente Andino, (B) Bajada calle Entre Ríos y (C) Barrancas del Río.

En cada punto de muestreo se obtiene una muestra de agua a 15-20 cm de la superficie, a la cual se le determina coliformes totales, coliformes termotolerantes, *E. coli*, anaerobios sulfito-reductores y *C. perfringens*.

De acuerdo con lo establecido por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, la prueba estándar para el grupo coliforme puede realizarse mediante una técnica de fermentación en tubos múltiples; los resultados del estudio de los tubos y diluciones replicados se comunican en términos de NMP (Numero Más Probable) de microorganismos existentes (APHA 2005; Collis C and Taylor C.D., 1969).

Los medios empleados para cada una de las determinaciones se preparan con anterioridad al día de muestreo según las especificaciones del proveedor. En el caso de las

técnicas que se llevan a cabo mediante tubos múltiples, se realizaron diluciones hasta 10^{-4} obteniéndose de esta manera cinco series (desde directo a 10^{-4}).

Para la determinación de coliformes totales se utilizaron cinco series de tres tubos con 10 ml de Caldo Lauril Sulfato (Britania) en simple concentración provistos de campanas de Durham. Se siembra 1 ml y se incuba en estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Se tomó como resultado positivo la producción de gas debido a la fermentación de la lactosa.

Para el caso de coliformes termotolerantes se toman los tubos positivos de la determinación de coliformes totales y mediante el ansa se traspasa a los tubos que contienen 10 ml de Caldo EC (Britania) y una campana de Durham. Se incuban en un baño termostático a $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. El resultado es positivo si se presenta la producción de gas característica (Fig. 3).

Para el análisis de *E. coli* se realiza el mismo procedimiento que para coliformes termotolerantes, utilizando en este caso, 5 ml de Agua Peptonada Bufferada (Britania). Se lleva a baño termostático a $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se agregaron unas gotas de reactivo Indol (Britania). Se toma como resultado positivo la aparición de un color rosa fuerte.

En la figura 3 se visualizan los resultados positivos y negativos de las muestras analizadas para coliformes totales; mientras que en la figura 4 los resultados de *E. coli*.

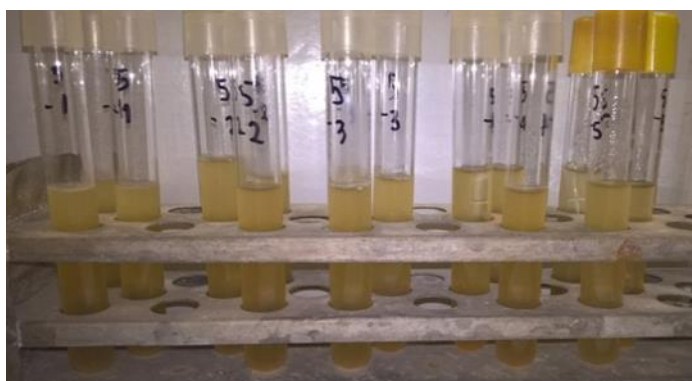


Figura 3: Resultados positivos y negativos de coliformes totales



Figura 4: Resultado positivo y negativo de *E. coli*.

Particularmente en el análisis del sitio de muestreo aguas abajo, Barrancas del Río, en el cuarto muestreo, se observa el valor de *E. coli* superior al de Coliformes termotolerantes. Esto se debe a la desviación propia de la tabla del número más probable utilizada (tabla de 3 tubos) debido que la diferencia entre ambos resultados es de un tubo positivo de 1 ml para *E. coli* y termotolerables respectivamente (tabla 1).

Tabla 1: Adaptación de acuerdo la fórmula de APHA, 2005 del cálculo de coliformes totales, termotolerantes y *E. coli* en la muestra de Barrancas del Río.

Muestra	Determinación	NMP tabla del número más probable.		Calculo de resultado	Resultado
		Tubos positivos	NMP/100 ml		
Barranca del Río (Muestreo 4)	Coliformes termotolerantes	320 (D a -2)	93	$\frac{93 \times 10^*}{1 \text{ ml}}$	930 NMP/100 ml
	<i>E. coli</i>	330 (D a -2)	240	$\frac{240 \times 10^*}{1 \text{ ml}}$	2400 NMP/100 ml

Por otro lado, para la determinación de anaerobios sulfito-reductores, se utiliza como referencia el método establecido por International Commission on Microbiological

Specifications for Foods (ICMSF) cambiando las placas por tubos para establecer con mayor eficiencia la anaerobiosis (ICMSF, 2000). Se siembra 1 ml de la muestra en 10 ml de agar triptosa-sulfito cicloserina (TSC) (Biokar), se incuba luego un tubo por cada serie en estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. La aparición de colonias negras indica un resultado positivo (fig. 5). Las mismas se cuentan, y se multiplica por el factor de la dilución correspondiente.



Figura 5. Resultados positivos y negativos para anaerobios sulfito-reductores

Finalmente, para la investigación de *C. perfringens* se aplica el método sugerido por el Consejo de la Comunidad Económica Europea (CCE, 1998), según el cual se realiza la filtración de distintos volúmenes de la muestra y se coloca la membrana filtrante en el agar m-CP, efectuando incubación en anaerobiosis durante 24 horas a $44 \pm 1^\circ\text{C}$.

El medio se prepara mediante el agar M-CP Base (Sigma Aldrich), al que se le adiciona D-cicloserina, el sulfato de polimixina y la solución de fenoltaleína (Sigma Aldrich), según lo requerido por el proveedor. La anaerobiosis se genera utilizando una jarra de anaerobiosis (Gas-PaK Anaerobic Systems) donde se coloca un sobre de anaerobiosis (Anaeropack-Anaero).

Tras la incubación, se exponen las colonias amarillas durante 2 minutos a los vapores de hidróxido de amonio, dando las colonias de *C. perfringens* un viraje al color rosado como se observa en la fig. 6. Para el cálculo de los resultados, se cuentan las colonias y expresa los mismos como ufc (unidades formadoras de colonias) por volumen de muestra filtrado.

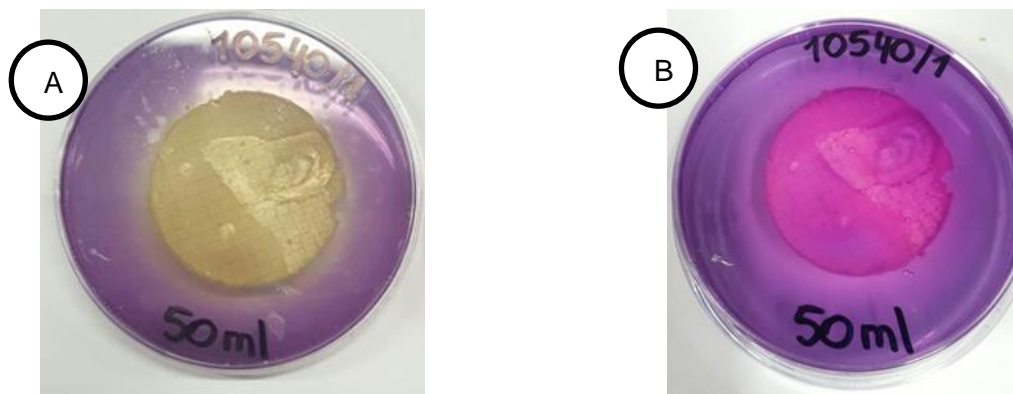


Figura 6: *C. perfringens* en 50 ml de muestra analizadas A) antes y B) después del revelado con hidróxido de amonio

Con respecto a la elección del volumen filtrado, se decidió utilizar en primera instancia lo indicado por la Directiva, sin embargo al hallarse resultados incuantificables (tabla 1), se disminuyó el volumen de muestra logrando de esta manera una mejor lectura. Por este motivo se determina *Clostridium perfringens* (ufc) en 10ml; 25ml; 50ml y 100ml, buscando la dilución más representativa.

Para el tercer muestreo se analiza el volumen indicado por la técnica (100 ml), ya que existe disminución en los valores obtenidos de los demás indicadores microbiológicos. Las diluciones realizadas y sus resultados se muestran en la tabla 2. Siendo PA Puente Andino; BE Bajada calle Entre Ríos; BR Barrancas del Río.

Tabla 2: Diluciones aplicadas en la determinación de *C. perfringens*.

Muestreo	Lugar de muestreo	<i>Clostridium perfringens</i> (ufc/10ml)	<i>Clostridium perfringens</i> (ufc/25ml)	<i>Clostridium perfringens</i> (ufc/50ml)	<i>Clostridium perfringens</i> (ufc/100ml)
1	PA	-	-	>50	>50
	BE	-	-	>50	>50
	BR	-	-	>50	>50
2	PA	<1	3	10	-
	BE	<1	8	15	-
	BR	1	1	6	-
3	PA	-	-	-	18
	BE	-	-	-	11
	BR	-	-	-	30

En el cuarto y quinto muestreo se determinó anaerobios sulfito-reductores ya que *C. perfringens* pertenece a este grupo de microorganismos anaerobios. La eficacia como indicadores de la calidad sanitaria de agua fue analizada en una investigación realizada por Gesche (Gesche et al. 2003). En la figura 5 se observan los resultados positivos y negativos obtenidos tras la determinación de los anaerobios sulfito-reductores.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 3 se detallan los resultados obtenidos de los parámetros microbiológicos de contaminación del agua superficial.

Tabla 3: Resultados de los muestreos realizados, siendo PA Puente Andino; BE Bajada Entre Ríos; BR Barrancas del Río.

Muestreo/Fecha	Lugar de muestro	Coliformes Totales	Coliformes termotolerantes	<i>E.coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Anaerobios sulfito-reductores
		(NMP/100ml)			(ufc/100ml)	(ufc/ml)
1 31/10/2017	PA	9300	400	400	>50	
	BE	9300	<300	<300	>50	
	BR	46000	<300	<300	>50	
2 24/04/2018	PA	15000	<300	<300	20	
	BE	4300	<300	<300	30	
	BR	39000	<300	<300	12	
3 19/06/2018	PA	70	<30	<30	18	40
	BE	390	70	<30	11	100
	BR	4600	70	70	30	1200
4 13/08/2018	PA	9600	<30	40		8
	BE	230	<30	<30		20
	BR	11000	930	2400		50
5 17/09/2018	PA	240	9	15		22
	BE	240	23	9		20
	BR	2400	75	75		4

Puede observarse en la tabla 3 y en la Fig. 7, que los valores hallados para coliformes totales (A) aumentan en el punto ubicado aguas abajo de la ciudad, BR Barrancas del Río, en todos los muestreos realizados. Tanto en los coliformes termotolerantes (B) como en los *E. coli* (C), se mantienen sus recuentos en algunos muestreos (1 y 2) y aumenta notablemente en otros, como en el muestreo 4.

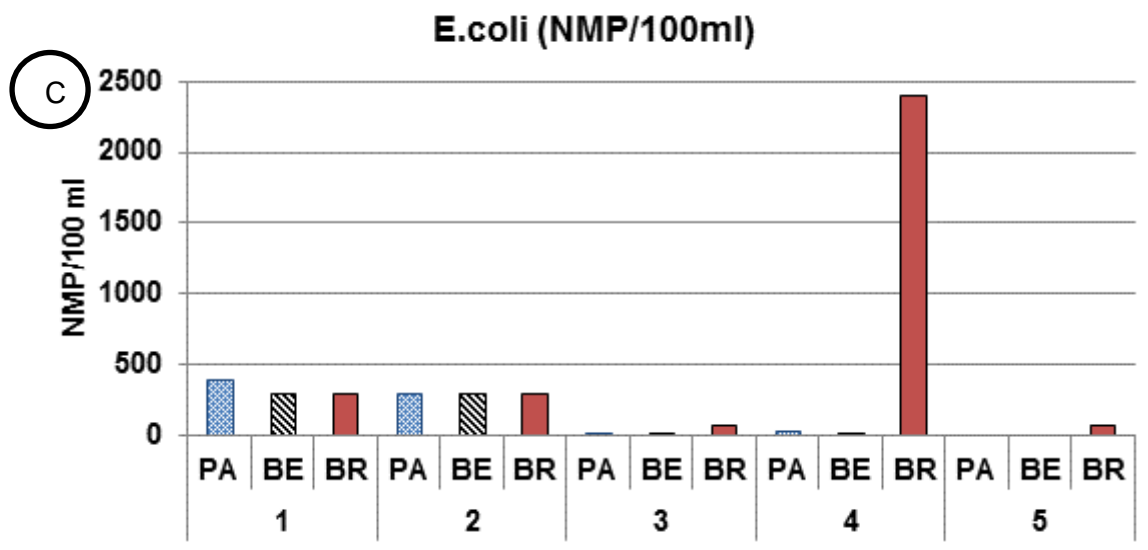
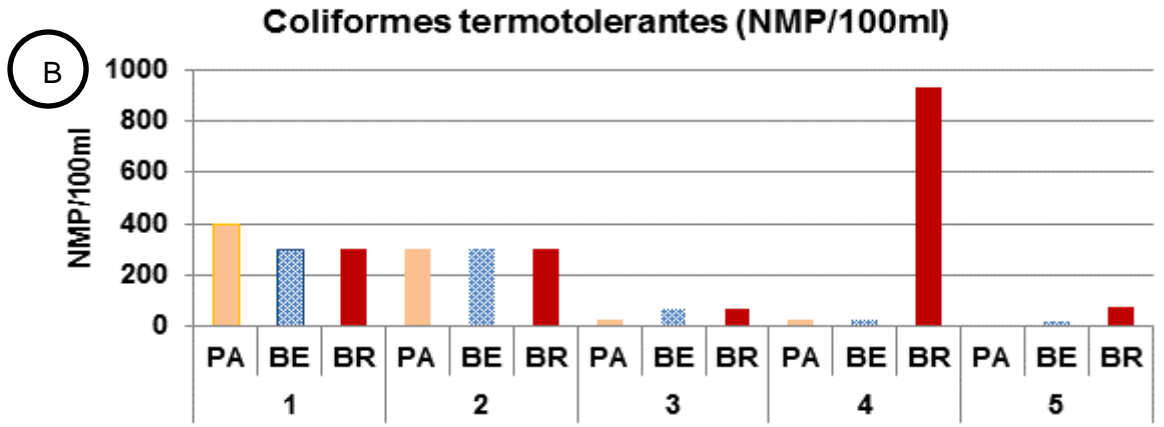
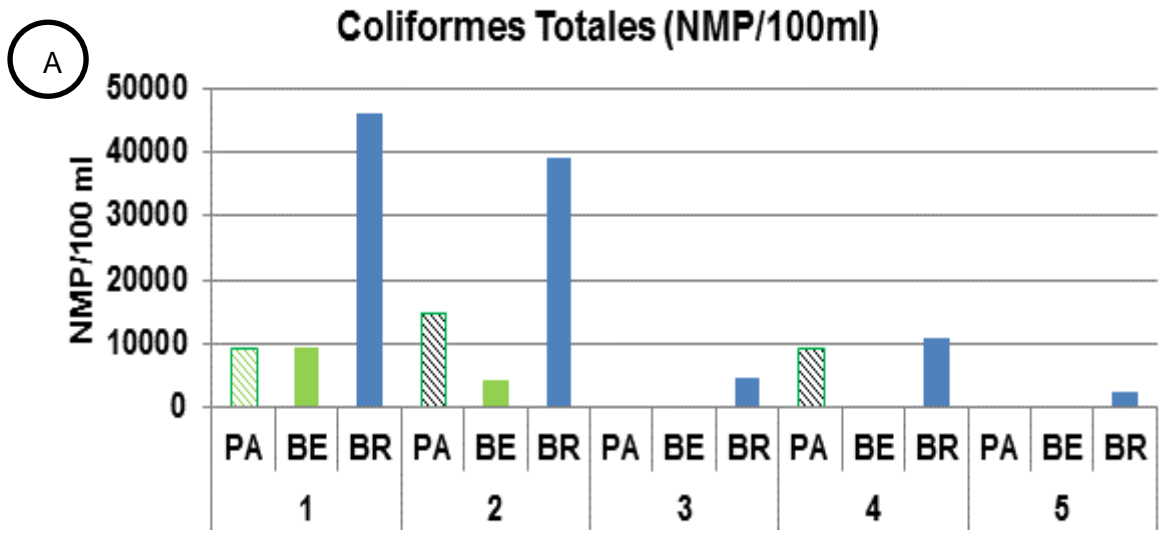


Figura 7. Seguimiento en los tres puntos de muestreo: aguas arriba PA (Puente Andino); región central del tramo BE (Bajada calle Entre Ríos); aguas abajo BR (Barrio Barrancas del Río).

En Fig. 8 se pueden observar los resultados para coliformes totales a lo largo de los meses de muestreo. En el Puente Andino se observa un comportamiento fluctuante de altos y bajos del número de bacterias coliformes.

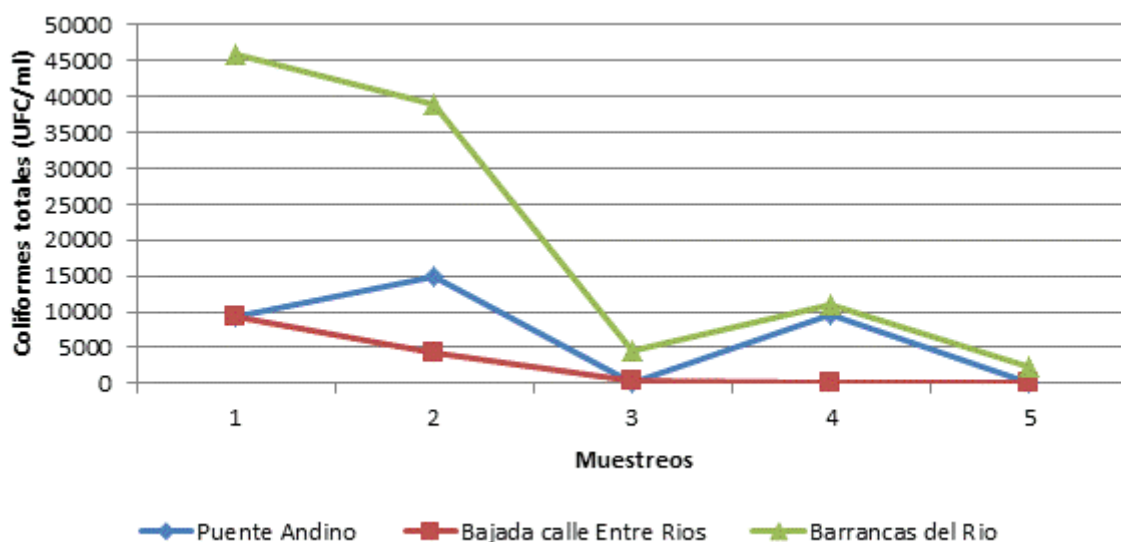


Figura 8: Representación de coliformes totales en el tramo en estudio en los 5 muestreos.

En todos los muestreos de Bajada calle Entre Ríos presenta en los valores más bajos, lo que puede deberse a la cercanía con el embalse del Balneario de la ciudad de Villa María, que produce una tiempo de retención del agua que podría favorecer la disminución de la contaminación microbiológica. Por otro lado, en Barrancas del Río presenta en los últimos 3 muestreos una conducta similar al del Puente Andino, esto puede relacionarse a que en ambos puntos se realizan recolecciones diarias de áridos (arena) con la correspondiente remoción de las márgenes arenosas como se puede observar en la Fig. 2. La diferencia de los resultados de los muestreos 1 y 2 con respecto a los demás, puede deberse a una actividad antrópica superior desarrollada en dicha zona. Por otra parte se observa el aporte de aguas pluviales al curso de agua, provenientes de la ciudad de Villa María y Villa Nueva, ubicadas ambas ciudades en ambas márgenes del Río.

Con respecto a la presencia de indicadores de contaminación fecal (Coliformes termotolerantes y *E. coli*) en todas las muestras analizadas el valor fue inferior a 1000 (NMP/100 ml), valor establecido como máximo en la norma provincial de la Provincia de Córdoba de aguas de vertido (MAA y SP a, 2016). Sin embargo para el tercer lugar analizado (Barrancas del Río) en el muestreo número cuatro, el valor de *E. coli* fue superior al de la norma y al de Coliformes termotolerantes, esto se debe a la desviación propia de la tabla del número más probable utilizada (tabla de 3 tubos) debido que la diferencia entre ambos resultados es de un tubo positivo de 1 ml (tabla 3) para *E.coli* y termotolerables respectivamente.

En el quinto muestreo se puede observar que los resultados de los parámetros microbiológicos tradicionales fueron inferiores en comparación con los hallados en los demás muestreos, se debe considerar que la noche anterior a la extracción, llovió y las compuertas del río se encontraban abiertas al momento de la toma de muestra.

En relación a la determinación de *C. perfringens* (muestreos 1, 2 y 3) y anaerobios sulfito reductores (muestreo 4 y 5), los valores obtenidos (tabla 2) no pueden ser

comparados con la legislación vigente para aguas recreacionales (Ministerio de Salud, 2017). Los resultados obtenidos están en concordancia a los informados por Gesche (Gesche et al. 2003), donde las muestras analizadas (14 muestras) fueron positivas anaerobios sulfito reductores (ASR) también presentaron coliformes totales y fecales.

En cuanto el riesgo de contacto directo para la población, de acuerdo a los valores guía de concentración de *E. coli* en el agua dulce recreativas, el 95% de las muestras no debe superar las 1000 NMP/100 (MAA y SPb). Con los resultados obtenidos de *E. coli*, se puede decir que de las muestras analizadas, sólo una superó dicho valor (2400 NMP/100ml Barrancas del río, pero el resto de las muestras no superó las 500 NMP/100 ml (tabla 3). Por lo anterior se puede decir el Río Ctlamochita presenta una baja contaminación de origen fecal durante el período muestreo, salvo en la zona de Barrancas Del Río donde se registró la máxima contaminación de origen fecal. Los resultados restantes obtenidos de *E. coli* fueron menores a las 500 NMP/100ml, límite considerado como Excelente para las aguas recreacionales por la Unión Europea (2006) (Ministerio de Salud, 2017).

CONCLUSIONES

Según los muestreos realizados en el tramo en estudio en el Río Ctlamochita, en la zona que comprende la ciudad de Villa María, se detecta un deterioro de su calidad bacteriológica debida a la contaminación antropogénica. Esto se ve reflejado en el aumento de las bacterias indicadoras, desde los valores iniciales encontrados en el primer punto de muestreo aguas arriba (Puente Andino), al último punto aguas abajo (Barrancas del Río).

Teniendo en cuenta el uso recreativo de este curso de agua en la zona en estudio, los valores encontrados en dichos indicadores no representan un riesgo para la población, teniendo en cuenta los parámetros microbiológicos para aguas recreacionales propuestos por el Ministerio de Salud de la Nación. De igual modo presenta un nivel bajo de contaminación, en relación a indicadores de origen fecal, según lo establecen las normas de la provincia de Córdoba para el agua de vertido a curso de agua superficial.

Si se considera la determinación de *C. perfringens* y anaerobios sulfito reductores, las muestras analizadas fueron positivas. Este resultado nos indica que los ASR pueden ser utilizados como indicador de la calidad sanitaria del agua, junto con los parámetros tradicionales de contaminación (Coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*).

BIBLIOGRAFIA

- ANMAT**, 2014. Análisis microbiológicos de los alimentos. Microorganismos indicadores, volumen 3, página 135.
- APHA AWWA; WPCF**, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. Ed. 21th, Estados Unidos.
- Ávila S. L. y Estupiñan S. M.**, 2009. Calidad sanitaria del agua de la Ciénaga Mata de Palma en el Departamento del Cesar, Colombia. Nova.; 7(11): 85-91
- CAMPOS C.**, 1999. Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de aguas residuales para riego agrícola". Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. 250 pp.
- Collis C and Taylor C.D.** 1969. Métodos Microbiológicos..pág. 163-169. Ed. Acribia. España.
- Comunidad Económica Europea, (CCE)** 1998. Directiva del consejo de 98/83/CE relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Cossavella A.M.; Carranza, P.; Oroná, C.; Monarde F.; Larrosa N.; Nadal F. ; Roque, M.; Nuño, C.; Hunziker, L.; Ferreyra, M., Brito, R.; Saldaño, V.; Melián, M.; Bresciano, J.; Díaz, A. ,** 2014. Gestión De Efluentes Líquidos En La Cuenca Del Río Tercero (Ctlamochita). III Jornadas De Difusión de Investigación y Extensión en Ingeniería Química – F.C.E.F.N.- Universidad Nacional de Córdoba.

Gesche, E.; Vallejos, A. y Saez, M. 2003. Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). *Arch. med. vet.* [online]., vol.35, n.1 [citado 2018-09-30], pp.99-107.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Food, of the International Union of Microbiological Societies), 2000. Microorganismos de los alimentos, volumen 1, páginas 275-284. Segunda edición, España.

Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos provincia Córdoba, 2016. Decreto 847/16. Normas para la protección de los recursos hídricos superficiales y subterráneos.

Ministerio de Salud. Departamento de salud ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud. 2017. Directrices sanitarias para uso seguro de aguas recreativas (Resolución Ministerial 125/2016) Argentina.