

Cortona Ruffino, Flabio

Estudio de correlación entre parámetros biológicos y microbiológicos con parámetros fisicoquímicos en agua para consumo humano

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Especialista en Tecnología de los Alimentos**

Directora: Grumelli, Yanina Alejandra

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

**ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y
MICROBIOLÓGICOS CON PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS EN AGUA PARA
CONSUMO HUMANO**

**Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de
Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de "Especialista en
Tecnología de los Alimentos"**

por

FLABIO CORTONA RUFFINO, Licenciado en Tecnología de los Alimentos

CÓRDOBA CAPITAL (CBA)

2020

DIRECTORA:

Mag. YANINA ALEJANDRA GRUMELLI

Integrantes de la Comisión del Trabajo

**Dra. María Florencia
Decarlini**

**Mag. Mariángeles Díaz
Panero**

Dr. Juan Pablo Vico

Agradecimientos

Si bien dedico unos párrafos apenas dando gracias a quienes se involucraron de forma más directa en la realización de este trabajo, no quisiera ser injusto con todos aquellos que no estarán entre estas líneas, porque necesitaría mucho más que solo unos párrafos para agradecerles a todos. No quisiera proseguir sin dar mis gracias a todos aquellos compañeros, colegas, amigos y familiares que influyeron e influyen en mi como profesional y como persona, y cuyos aportes me han llevado a ser quien soy y han colaborado en mis logros, y a quienes llevo siempre presentes.

En primer lugar, agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba, a mis profesores de grado y posgrado, quienes desde su sabiduría transmitieron sus conocimientos, brindando constante apoyo, enriqueciéndome como profesional y como ser humano.

Agradezco a las autoridades de esta carrera de posgrado, a la Dra. Ana María Vázquez y al Dr. Marcelo Rosmini que con su apoyo, su constante aliento y sus aportes para con este ensayo, han sido los promotores de mi formación de posgrado.

También agradezco a mi Directora de Tesis y querida amiga, la Mag. Yanina Alejandra Grumelli, quien depositó en mí su confianza y cuya experiencia, conocimiento y motivación fueron el faro que iluminaron mi trayecto hasta la culminación de este estudio. Eternamente gracias a sus enseñanzas, consejos, apoyo y sobre todo incondicional amistad.

Especialmente doy gracias al personal del Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba, pieza clave en mi formación académica y profesional, pero sobre todo personal, con quienes obtuve los datos utilizados para la realización de esta investigación, pero por sobre todo, quienes tienen un lugar en mi corazón por ser excelentes personas e incondicionales amigos.

Más que nadie, merecen mi especial agradecimiento y mi dedicación de este trabajo final mis padres y hermanos, mi familia, mi pilar fundamental, mi motor y mi mayor inspiración, quienes siempre han estado a mi lado, brindándome su apoyo incondicional, compartiendo alegrías y angustias, que a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino, y que son el estímulo para la autosuperación diaria.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer al amor de mi vida, Fernanda Lorenzo. La ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, siempre fuiste muy motivadora y esperanzadora. Gracias por escucharme, por tratar siempre de sacarme una sonrisa, incluso en los peores momentos, por cuidarme y respetarme, y por brindarme todo tu amor y permitirme ser parte de tu vida, y que vos seas parte tan importante de la mía, te amo con todo mi corazón.

Índice general

Abreviaturas	4
Unidades	5
Símbolos	5
Símbolos químicos	6
Índice de Figuras	7
Índice de Tablas	8
Resumen	9
Summary	10
Desarrollo	11
Materiales y métodos	20
Programa de muestreo	20
Analitos a investigar, justificación y su correspondiente metodología analítica	22
a. Turbidez o Turbiedad:	22
b. Color:	24
c. Fitoplancton:	25
d. Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) o Bacterias Heterótrofas:	35
e. <i>Escherichia coli</i> y Bacterias Coliformes Totales:	38
f. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	40
g. Metodología estadística analítica aplicada para el tratamiento de los datos	43
Exposición y tratamiento estadístico de los datos obtenidos	47
Discusiones y Conclusiones	55
Anexos: técnicas analíticas:	61
Determinación de la turbidez por el Método Nefelométrico (APHA 2130-B):	61
a. Principio:	61
b. Aparatología:	61
c. Reactivos	63
d. Procedimiento	65
e. Interpretación de los resultados	67
Determinación del color por el Método de Comparación Visual (APHA 2120-B):	67
a. Principio:	67
b. Muestreo:	69

f. Aparatología:	69
d. Elaboración de estándares:	69
e. Procedimiento:	70
f. Cálculos:	70
Determinación de Fitoplancton (APHA 10200 A-F):	71
a. Técnicas de concentración:	72
b. Ensamblaje de los preparados:	74
c. Técnicas de recuento de fitoplancton	76
d. Procedimientos de conteo:	77
Recuento de Bacterias heterótrofas por el método de recuento en placa vertida (APHA 9215-B):	80
a. Método de placa vertida:	80
b. Método de la placa de propagación o siembra en superficie:	80
c. Método de filtro de membrana:	81
Detección y enumeración de <i>E. coli</i> y bacterias coliformes totales mediante el método de filtración de membrana (ISO 9308:2000-1):	90
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC):	91
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC):	92
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC):	94
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC):	94
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC):	95
<i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC):	96
Técnica para su investigación por el método de filtración por membrana:	98
<i>P. aeruginosa</i> : Determinación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según la técnica de filtración por membranas (APHA 9213 E):	102
a. Descripción general:	102
b. Efectos sobre la salud humana:	103
c. Fuentes y prevalencia:	103
d. Vías de exposición:	103
e. Relevancia de su presencia en el agua de consumo:	103
f. Procedimiento para su detección:	104
Análisis estadístico de correlación lineal por el coeficiente de Pearson:	105
Tablas adicionales resultantes del tratamiento estadístico de los datos:	111
Glosario:	117
Citas Bibliográficas	125

Abreviaturas

- APHA: American Public Health Association.
- BAM: Bacterias Aerobias Mesófilas.
- E. coli: Escherichia coli.
- EHEC: *E. coli* Enterohemorrágico.
- EIEC: *E. coli* Enteroinvasivo.
- EPEC: *E. coli* Enteropatógenos.
- ETEC: *E. coli* Enterotoxigénico.
- FM: Método cuantitativo de filtración de membrana.
- IRAM: El Instituto Argentino de Normalización y Certificación (originalmente Instituto de Racionalización Argentino de Materiales: IRAM) es el instituto encargado de la normalización y certificación, en Argentina.
- ISO: Originalmente en inglés: International Organization for Standardization, la Organización Internacional de Normalización, también llamada Organización Internacional de Estandarización es una organización para la creación de estándares internacionales compuesta por diversas organizaciones nacionales de normalización.
- TM: Método cuantitativo de tubos múltiples.
- UV: Ultra violeta.

Unidades

- μm: Micrómetros, micrones o micras.
- cm: Centímetros.
- K: Grados kelvin
- kPa: Kilo Pascales.
- L: Litro.
- MDa: Megadáltones
- mg: Miligramo.
- mL: Mililitro
- nm: Nanómetros.
- UC: Unidades de Color.
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias.
- UNT: Unidades Nefelométricas de turbidez. También se puede encontrar en la bibliografía como “NTU”, que deriva de los vocablos en la lengua inglesa “Nephelometric Turbidity Unit”.

Símbolos

- ®: Marca registrada

Símbolos químicos

- Co: Cobalto.
- H₂SO₄: Ácido sulfúrico
- HCl: Ácido clorhídrico.
- HNO₃: Ácido nítrico.
- K₂Cr₂O₇: Dicromato de potasio.
- Na₂S₂O₃: tiosulfato sodio.
- NaOCl: Hipoclorito de sodio.
- Pt: Platino.

Índice de Figuras

Figura 1: Gráficos adicionales para el parámetro "turbidez"	112
Figura 2: Gráficos adicionales para el parámetro "color"	114
Figura 3: Gráficos adicionales para el parámetro "fitoplancton"	116

Índice de Tablas

Tabla 1: Equivalentes de toxicidad correspondientes a cianotoxinas cuya presencia en el agua de consumo puede afectar a la salud	32
Tabla 2: Tabla general de datos de los ensayos realizados a las muestras de agua apta para consumo humano correspondiente al monitoreo período del servicio de suministro de agua potable en la provincia de Córdoba, en el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018	48
Tabla 3: Tabla estadística que detalla los resultados de la aplicación del análisis estadístico de correlación lineal mediante el coeficiente de Pearson	53
Tabla 4: Informe de las lecturas de turbidez según los valores detectados	67
Tabla 5: Informe de las lecturas de color según los valores detectados	71
Tabla 6: Metodología sugerida para el informe de los recuentos hallados	76

Resumen

ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS CON PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS EN AGUA PARA CONSUMO HUMANO

Este trabajo pretende determinar la relación que existe entre diferentes analitos presentes en el agua destinada al consumo humano, distribuida en el territorio de la provincia de Córdoba por los diferentes actores autorizados para tal fin, mediante la comparación de variables analíticas de origen fisicoquímico, biológico y microbiológico. Para lo cual se toman como datos los resultados de análisis que fueron realizados por el Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba en el marco del programa de monitoreo de muestras de agua potable tomadas en distintos puntos de esa provincia en el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018.

Las muestras fueron tomadas y analizadas mediante técnicas oficiales de reconocimiento internacional, adoptadas por el Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos de la Secretaría de Recursos Hídricos de la provincia de Córdoba, como referencia establecidas para la Resolución Provincial 174/16: "Normas de Calidad y Control de Aguas Para Bebida", quienes normalizan valores de referencia que enmarcan los diferentes tipos y calidades de agua generados en la provincia, publicada el día 3 de agosto de 2016.

Como se enunció anteriormente se definen para este estudio variables de origen fisicoquímico, como lo son la turbiedad o turbidez y el color; parámetros biológicos, en este caso la presencia y caracterización del Fitoplancton contenido en dichas muestras; y parámetros microbiológicos como lo son el recuento Bacterias Heterótrofas o Bacterias Aerobias Mesófilas, la detección y enumeración de *E. coli* y bacterias coliformes totales y la determinación de *P. aeruginosa*. Las mismas serán tratadas estadísticamente mediante un análisis de correlación para comprobar científicamente el grado de relación existente.

Palabras Clave: analitos, técnicas oficiales, grado de relación

Summary

CORRELATION STUDY BETWEEN BIOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS WITH PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS IN WATER FOR HUMAN CONSUMPTION

This assay aims to determine the relationship between different analytes present in water intended for human consumption, distributed in the territory of the province of Córdoba by the different actors authorized for this purpose, by comparing analytical variables of physical, chemical and biological origin. microbiological. To this end, the results of the analysis carried out by the Central Laboratory of the Faculty of Chemical Sciences of the Catholic University of Córdoba are taken as part of the monitoring program of drinking water samples taken in different points of that province in the period between February 2017 and March 2018.

The samples were taken and analyzed by official techniques of international recognition, adopted by the Ministry of Water, Environment and Public Services of the Secretariat of Water Resources of the province of Córdoba, as a reference established for Resolution 174/16: "Provincial Regulations of Quality and Control of Drinking Water", who normalize reference values that frame the different types and qualities of water generated in the province, published on August 3, 2016.

As stated earlier, variables of physicochemical origin are defined for this study, such as turbidity or turbidity and color; biological parameters, in this case the presence and characterization of the phytoplankton contained in said samples; and microbiological parameters such as the count Heterotrophic Bacteria or Aerobic Mesophilic Bacteria, the detection and enumeration of *E. coli* and coliform bacteria tolales and the determination of *P. aeruginosa*. These will be treated statistically through a correlation analysis to scientifically verify the degree of existing relationship.

Key words: analytes, official techniques, degree of relationship

Desarrollo

El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio (suficiente, inocuo y accesible). La mejora del acceso al agua potable puede proporcionar beneficios tangibles para la salud. Debe realizarse el máximo esfuerzo para lograr que la inocuidad del agua de consumo sea lo más estricta posible, cumpliendo con los estándares Nacionales propuestos.

El agua apta para consumo humano, no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes vulnerabilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida.

Las personas que presentan mayor riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el agua son los lactantes y los niños de corta edad, las personas debilitadas o que viven en condiciones antihigiénicas y los ancianos. El agua potable es adecuada para todos los usos domésticos habituales, incluida la higiene personal, como también es la materia prima de base para la elaboración de agua envasada y hielo destinado al consumo humano, y como insumo empleado tanto en la elaboración de todo tipo de alimentos como en los procesos de sanitización en establecimientos dedicados a la producción de estos productos. No obstante, puede necesitarse agua de mayor calidad para algunos fines específicos, como la diálisis renal y la limpieza de lentes de contacto, y para determinados usos farmacéuticos, médicos y de producción de alimentos especiales.

Las personas con inmunodeficiencia grave posiblemente deban tomar precauciones adicionales para el consumo de agua, por más de que esta sea potable, debido a su sensibilidad a microorganismos cuya presencia en el agua de consumo normalmente no sería preocupante.

Las normas sobre el agua de consumo pueden diferir, en naturaleza y forma, de unos países o regiones, a otros. No hay un método único para el establecimiento y monitoreo de los parámetros de calidad del agua destinada al consumo humano que pueda aplicarse de forma universal, aunque existen ya muchos consensuados en el ámbito científico. En la elaboración y la aplicación de normas, es fundamental tener en cuenta las leyes vigentes y en proyecto relativas al agua, a la salud y al

gobierno local, así como evaluar la capacidad para desarrollar y aplicar reglamentos de cada país. Los métodos que pueden funcionar en un país o región no necesariamente podrán transferirse a otros países o regiones. Para desarrollar un marco reglamentario, es fundamental que cada país examine sus necesidades y capacidades contemplando las potenciales fuentes de las que se podría capturar el agua, la calidad inicial de la misma y los tratamientos necesarios para transformarla en un producto apto para el consumo humano.

La determinación de la seguridad, o de qué riesgo se considera aceptable en circunstancias concretas, es un asunto que concierne al conjunto de la sociedad. En último término, es responsabilidad de cada país decidir si las ventajas de adoptar como norma nacional o local alguna de las directrices o valores de referencia aportan seguridad y justifican su costo asociado.

Los requisitos básicos y esenciales para garantizar la seguridad del agua de consumo son: un “marco” para la seguridad del agua que comprenda metas de protección de la salud establecidas por una autoridad con competencia en materia sanitaria, sistemas adecuados y gestionados correctamente (infraestructuras adecuadas, monitoreo correcto, y planificación y gestión eficaces), y un sistema de vigilancia independiente.

La aplicación de un enfoque integral a la evaluación y la gestión de los riesgos de los sistemas de abastecimiento de agua de consumo aumenta la confianza en la inocuidad del agua. Este enfoque conlleva la evaluación sistemática de los riesgos en la totalidad de un sistema de abastecimiento de agua de consumo -desde el agua de origen y la cuenca de captación al consumidor- y la determinación de las medidas que pueden aplicarse para gestionar estos riesgos, así como de métodos para garantizar el funcionamiento eficaz de las medidas de control. Incorpora estrategias para abordar la gestión cotidiana de la calidad del agua y hacer frente a las alteraciones y averías ⁽¹¹⁾.

La gran mayoría de los problemas de salud relacionados de forma evidente con el agua se deben a la contaminación por microorganismos (bacterias, virus, protozoos u otros organismos). No obstante, existe un número considerable de problemas graves de salud que pueden producirse como consecuencia de la contaminación química del agua de consumo ⁽¹⁾.

La contaminación de las aguas puede proceder de fuentes naturales o de actividades humanas. La contaminación natural es difusa y se debe al arrastre de partículas o de gases atmosféricos por las gotas de lluvia, a pólenes, esporas, hojas secas u otros residuos vegetales y a excrementos de peces o de aves acuáticas. La capacidad natural de autodepuración hace que sean eliminados en su mayor parte. La autodepuración es el conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar de un modo natural en una masa de agua y que tienden a destruir todos los contaminantes incorporados a la misma ⁽²⁾.

En la actualidad la más importante, sin duda, es la provocada por el hombre. Tanto el desarrollo y la industrialización suponen un mayor uso de agua y una gran generación de residuos, muchos de los cuales son vehiculizados a través de este preciado recurso, como también el uso de medios de transporte fluviales y marítimos son, en muchas ocasiones, causa de contaminación de las aguas. Este daño ecológico se origina en las actividades que se desarrollan diariamente, como son las industriales, mineras, agropecuarias, artesanales y domésticas y es más grave por su naturaleza y la gran variedad de contaminantes que genera ⁽³⁾.

No sólo son procesos contaminantes o degradantes del recurso agua los que afectan a su calidad haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca y las actividades recreativas, sino también aquellos que producen una alteración del receptor hídrico, afectando a su cantidad o caudal disponible en un determinado lugar y tiempo.

El origen de la contaminación antropogénica de las aguas está ligado a alguna de estas cuatro actividades:

- Urbanas: la contaminación de las aguas debida a actividades urbanas, es consecuencia de la inadecuada eliminación y ubicación de los residuos, junto a las aguas residuales urbanas procedentes de usos domésticos (limpieza y cocina) y sanitarios, así como de la limpieza de calles insuficientemente tratados. Las aguas residuales urbanas contienen fundamentalmente contaminantes orgánicos procedentes de vertidos de residuos sólidos, efluentes líquidos domésticos, lavado de las vías de circulación y espacios públicos, fugas de colectores y alcantarillas, fosas sépticas, así como papeles, detergentes, aceites, restos de plásticos, etc.; también la presencia de bacterias, virus, algas y otros microorganismos acompañando a algunos de los anteriores.

La contaminación se difunde de las siguientes formas:

1. Si estas aguas se vierten sin depurar a cauces y arroyos, éstos quedan contaminados, por lo que poblaciones próximas situadas aguas abajo, deberán tenerlo en cuenta a la hora de elegirlos como captaciones de agua.

2. Por averías en las redes de saneamiento, si se producen roturas, retrosifonajes, filtraciones, fugas y cualquier otro tipo de contacto con las aguas de consumo.

3. En los casos de urbanizaciones clandestinas (viviendas de recreo próximas a grandes núcleos urbanos) que utilizan pozos ciegos para eliminar sus aguas residuales. Esta práctica está prohibida por la contaminación que puede provocar en los acuíferos subyacentes.

- Agrícolas: La contaminación de las aguas por prácticas agrícolas es debida fundamentalmente a la utilización de fertilizantes y biocidas en exceso, así como a la presencia de alpechín y otros residuos agrícolas. Los fertilizantes son ricos en compuestos nitrogenados y fosforados, siendo lavados y arrastrados de la superficie por lluvias y escorrentías, que los conducen a cauces de ríos y de ahí a lagos o embalses favoreciendo su eutrofización. Por otra parte, muchos de los biocidas utilizados en la agricultura presentan una alta toxicidad y persistencia, con alta capacidad de acumulación en los organismos vivos.

- Ganaderas: la contaminación de aguas por explotaciones ganaderas es debida a compuestos orgánicos y biológicos procedentes de residuos de instalaciones ganaderas y purines de animales estabulados. Las aguas utilizadas en las explotaciones ganaderas, sobre todo para operaciones de limpieza, pueden arrastrar el estiércol, los purines producidos, así como restos de plaguicidas de origen ganadero. Normalmente y dadas las altas cargas que esto significa, se intenta retirar como residuo. Si las balsas de excretas de las granjas no están bien construidas o no son impermeables, contaminan el terreno y por consiguiente los acuíferos.

- Industriales: la contaminación del agua por actividades industriales es la más diversa, compleja y en muchos casos difícil de eliminar. El agua es un elemento fundamental en las actividades industriales, como vehículo energético, de transporte, disolvente, en operaciones de lavado, base para reacciones,

intercambiadores de calor, y, fundamentalmente como materia prima; al mismo tiempo es, quizás, la actividad más contaminante de las aguas. Los vertidos industriales se caracterizan por:

- Materia en suspensión.
- Materia orgánica disuelta o en suspensión.
- pH generalmente ácido.
- Elementos tóxicos disueltos.
- Temperaturas superiores a la del receptor.
- Aceites y grasas.

Los productos de cada uno de estas fuentes de contaminación guardan cierta semejanza entre sí. Así, por ejemplo, la contaminación urbana se manifiesta por el aumento de la salinidad en el agua, adición de materia orgánica y posible contaminación biológica, mientras que la contaminación de origen agrícola, se manifiesta por fuertes incrementos de compuestos nitrogenados, la presencia de organoclorados y otros compuestos orgánicos en las aguas.

Los procesos contaminantes, independientemente de su origen, se encuentran afectados, en cantidad e importancia, por las características del medio receptor, los usos del agua y calidades exigidas a la misma, aportes hídricos indirectos en relación a las características de la zona y otros factores que afecten a la dispersión de los contaminantes ⁽⁴⁾.

La principal consecuencia de la contaminación los cuerpos de agua, ya sean naturales o artificiales, es la eutrofización. Este es el proceso por el que las aguas se enriquecen en derivados del nitrógeno y fosfatos que sirven de nutrientes a cierto grupo de algas y bacterias. Estos derivados ricos en fósforo y nitrógeno provienen de los vertidos de las aguas de ciudades y pequeñas industrias.

En principio se podría pensar que este enriquecimiento en algas podría resultar beneficioso para el resto de los organismos de los cuerpos de agua móviles -como los ríos- y estáticos - como lagos y lagunas entre otros- pero no es así. La razón es que estas algas proliferan muy rápidamente, se sitúan en la superficie del agua e impiden que la luz del Sol llegue a zonas más profundas. Esto hace que

otras plantas y animales no puedan desarrollarse normalmente. Se agota el oxígeno en el interior y la putrefacción de la materia orgánica tiende a acumularse en el fondo.

Este fenómeno supone un enorme desafío para el sistema de depuración natural de los reservorios del vital recurso, y para todos los que de este derivan. Como consecuencia de la contaminación de ríos y lagos se alteran su fauna y su flora naturales y sus aguas adquieren un aspecto y olor desagradables, dejando de ser útiles para la mayoría de los usos.

Los ríos, por su dinámica, pueden contrarrestar mejor la contaminación. Sin embargo, los cuerpos estáticos de agua, el problema adquiere una mayor magnitud y el equilibrio natural se altera con más facilidad, provocando que algunas especies desaparezcan mientras que otras se desarrollan en exceso ⁽²⁾.

Los tratamientos de potabilización del agua que será destinada al consumo humano deben reducir el nivel de todos los contaminantes que se encuentran en dicho recurso a niveles tolerables para el ser humano, pero no siempre es posible debido a la alta concentración de los contaminantes que se encuentran en el agua antes de su tratamiento. Como consecuencia, es de imperiosa necesidad el establecimiento de parámetros de calidad acordes a los diferentes destinos que tendrá el agua, como así también de los efluentes que deriven de cualquier actividad humana, que involucre una inserción de componentes, y concentraciones de los mismos, que no son naturales en los reservorios de agua de los que se obtiene esta como materia prima, y los que no tienen la capacidad de degradar naturalmente dichos contaminantes.

Es también tan importante como el establecimiento de estos parámetros, su fiscalización por parte de organismos estatales que aseguren la calidad del producto que las empresas potabilizadoras ponen a disposición de los consumidores. Para ello, es necesario llevar a cabo el monitoreo a cada uno de los proveedores del suministro de agua potable, para detectar de manera temprana cualquier desvío a los parámetros establecidos, y poder evitar complicaciones sanitarias hacia los destinatarios del servicio, por lo que sería interesante que por medio de determinaciones analíticas rápidas que permitan detectar componentes o características que afectan la aceptabilidad del agua por parte del consumidor (como los son la turbidez y el color), se pueda inferir la presencia de componentes

que afectan la salud de los consumidores (como lo son la presencia de fitoplancton y las toxinas que de este derivan, y las bacterias patógenas de mayor difusión). A partir de esta última interpretación se plantea la **hipótesis** que guía el desarrollo de este trabajo de final:

“Existe una relación directa entre el color y la turbidez del agua destinada al consumo humano con la presencia de algas productoras de toxinas y bacterias que representan un peligro para la salud de los consumidores.”

A partir de dicho enunciado se llevó a cabo esta investigación teniendo como **objetivos:**

- Realizar una interpretación de parámetros físico químicos, como la turbidez y el color; biológicos, como el fitoplancton; y microbiológicos, como las Bacterias Aerobias Mesófilas, Coliformes Totales, *E. coli* y *P. aeruginosa*, para dar cuenta de la calidad real del agua destinada y distribuida para consumo humano en la provincia de Córdoba
- Descubrir la existencia y grado de relación entre parámetros anteriormente enunciados
- Encontrar datos de origen fisicoquímico, de rápida medición, que pueda tener variaciones significativas y que consecuentemente permita alertar a la población en cuanto a la calidad y grado de inocuidad del agua que se está consumiendo

En la provincia de Córdoba, estos parámetros están establecidos por la Secretaría de Recursos Hídricos de la provincia de Córdoba, reglamentados por la Resolución 174/16: “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida”, quienes normalizan valores de referencia que enmarcan los diferentes tipos y calidades de agua generados en la provincia, publicada el día 3 de agosto de 2016.

En base a esta reglamentación el organismo estatal a cargo del monitoreo y fiscalización de la calidad de los servicios públicos prestados a los habitantes de

la provincia, en este caso el servicio de agua potable, tiene poder de policía para realizar los controles pertinentes a los fines de garantizar dicho servicio, y tomar las medidas sancionatorias y las acciones correctivas necesarias para garantizar el cumplimiento de los parámetros de calidad establecidos en el decreto provincial anteriormente enunciado, que tienen como finalidad la satisfacción de las necesidades básicas los consumidores brindándoles la mejor calidad del recurso hídrico.

La implementación de dicho monitoreo se materializa involucrando diferentes entidades científicas que se encargan de la recolección de las muestras en los distintos entes prestadores del servicio de provisión de agua potable de diferentes zonas urbanas de la provincia, y su procesamiento para la medición de parámetros fisicoquímicos, biológicos y microbiológicos que indican la calidad del agua que dichos prestadores hacen llegar a los consumidores. De todos los parámetros establecidos por la Resolución Provincial N° 174/16, se tomarán para este trabajo de investigación solo algunos de distintas naturalezas, a los fines de poder compararlos en la búsqueda de una correlación entre los mismos que explique la variación en la calidad del recurso brindado. Estos parámetros son de naturaleza fisicoquímica, como la turbidez y el color; biológica, como la presencia y cantidad de fitoplancton encontrado en las muestras analizadas; y microbiológica, como la presencia y cantidad de microorganismos indicadores (Bacterias Aerobias Mesófilas, Coliformes Totales) y patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Las mediciones de estos parámetros tienen vital importancia desde el punto de vista sanitario, debido a que permiten determinar la calidad del agua destinada para el consumo humano, y detectar de manera temprana desvíos de alguno de estos parámetros, y poder tomar acciones correctivas para prevenir potenciales peligros para la salud de los consumidores.

Se aplicarán a los datos derivados del muestreo un análisis de correlación lineal. Este análisis tiene como objetivos encontrar las causas por las que se producen las variaciones en los parámetros analizados, que representan atributos de calidad del recurso hídrico brindado por los diferentes prestadores de servicio a los habitantes de las diferentes zonas urbanas, atributos que pueden encontrar desviaciones detectables por los consumidores del recurso, y que pueden causar rechazo por parte de éstos por defectos en los caracteres organolépticos del

recurso suministrado y que potencialmente representan un peligro para su salud. Concretamente este estudio persigue el fin de identificar si los desvíos en la turbidez y el color percibidos empíricamente en el suministro guardan relación entre ellos, y con los demás parámetros considerados, que tipo de relación existe entre ellos, y si dicha relación indicaría potenciales riesgos para la salud de los consumidores.

Los parámetros anteriormente nombrados están mundialmente estandarizados, y existe cuantiosa bibliografía que detalla su fundamento y diferentes técnicas de aplicación. A los fines de este trabajo se empleará la versión vigente, correspondiente con la vigésimo tercera edición del manual de Métodos Estandarizados para el Análisis de Aguas y Efluentes (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) de la Asociación de Salud Pública de Norte América (American Public Health Association, APHA) como referencia, que condensa estas y las demás técnicas empleadas para analizar la calidad del agua destinada a diferentes usos, como también los efluentes que derivan de la actividad humana.

Las técnicas utilizadas para la investigación de cada uno de estos analitos han sido seleccionadas debido a que se corresponden también con la metodología oficial establecida por el Código Alimentario Argentino para la determinación de la calidad del agua destinada al consumo humano, en si capítulo XII.

Materiales y métodos

Programa de muestreo

Para determinar la calidad del producto final que los establecimientos distribuidores del suministro deben alcanzar para brindárselo a los consumidores, se llevó a cabo una comparación entre diferentes parámetros estudiados en 94 muestras de agua potabilizada recolectadas en toda la provincia de Córdoba, como parte de un programa de monitoreo de este servicio en diferentes zonas urbanas de la provincia, durante el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018, abarcando así las diferentes situaciones climáticas de la región, que permitirá también verificar su influencia en los diferentes parámetros involucrados, y la relación que ocurre entre estos en dichas condiciones.

Específicamente, se pretende identificar el grado de relación que existe entre los parámetros seleccionados para este estudio, como así también las interacciones que surgen entre los mismos.

Las unidades muestrales que comprenden este análisis fueron recolectadas en el período anteriormente mencionado, que se dividió en 61 semanas, en las cuales se recolectaban las muestras entre 2 a 3 veces por semana, generalmente los primeros días de las mismas, en horarios comprendidos en el período desde las 7:00 y las 16:00 de cada día, siguiendo un recorrido previamente estipulado, que dividió a la provincia de Córdoba en diferentes zonas (Sierras de Punilla, Sierras de Calamuchita, Norte, Sureste, Suroeste y Sur), recorriendo distancias de aproximadamente 350 km por jornada de muestreo, conservando dichas muestras debidamente aisladas y refrigeradas hasta su remisión al laboratorio para su procesamiento, una vez concluida la jornada.

Cabe destacar que las muestras fueron tomadas acorde a lo dispuesto por las normas IRAM 29012-1. 2002: "Calidad del medio ambiente. Calidad del agua. Muestreo. Parte 2: Directivas generales sobre técnicas"; IRAM 29012-3: 1998. "Calidad del medio ambiente. Calidad del agua. Muestreo parte 3: Guía para

preservación y manipulación de las muestras”; y lo recomendado en el capítulo de muestreo de la Resolución 174/16: “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida”.

En todas las oportunidades, las muestras fueron recogidas en envases de único uso, y del material adecuado para el tipo de ensayo a que las mismas iban destinadas: en los casos de los ensayos físico químicos fueron recolectados 2 L de muestra en envases plásticos sin cámara de aire; si nos referimos a las muestras para los ensayos de fitoplancton, las mismas eran de 1 L, siendo colectadas en envases de vidrio color caramelo acondicionado con Lugol; en el caso de las muestras destinadas para la realización de ensayos microbiológicos, estas estaban compuestas por 500 mL fueron tomadas y conservadas en recipientes estériles, con el agregado de solución de tiosulfato de sodio al 3% para neutralizar el cloro residual presente en el agua potable, a los fines de conservar la carga microbiológica de la muestra hasta el momento de su análisis.

Al momento de la recolección de las muestras, se realizaron mediciones in situ de parámetros altamente susceptibles a ser modificados por el transcurso del tiempo, sin importar las condiciones de conservación, como lo son la medición del pH de las diferentes muestras y su concentración de cloro residual, según las técnicas oficiales especificadas en la bibliografía anteriormente mencionada.

Una vez tomadas las diferentes muestras, fueron conservadas a temperaturas de entre 1° C y 4 ° C, para minimizar la posibilidad de deterioro de los analitos a investigar, hasta su llegada al Laboratorio, donde continuarían con la cadena de frío hasta su procesamiento. La cantidad excedente de muestra seguirían siendo conservadas en estas condiciones hasta el final del ensayo, teniéndola como respaldo en caso de necesidad de repetición.

Ya en el laboratorio, las muestras fueron procesadas para la detección de los diferentes analitos dentro de las 24 hs desde su recepción, involucrando el tiempo y los materiales necesarios según las técnicas aplicadas para la detección de cada uno de ellos, registrando en la documentación interna del Laboratorio todos los resultados y los pasos intermedios en las técnicas analíticas, a los fines de poder obtener resultados finales trazables.

Analitos a investigar, justificación y su correspondiente metodología analítica

Justificación de los analitos elegidos: los siguientes párrafos detallan los analitos investigados y las técnicas empleadas para tal fin. Estos analitos fueron específicamente seleccionados debido a que son empleados de manera tanto histórica como universal como indicadores de la calidad higiénico-sanitaria de este vital recurso. Las técnicas empleadas para determinar cada uno de estos parámetros son mundialmente reconocidas y permiten generar un análisis estadístico con un altísimo nivel de confianza.

A continuación, se describirán los analitos que han sido elegidos para a este estudio, como así también las técnicas utilizadas para detectarlos:

a. Turbidez o Turbiedad:

La presencia de materias diversas en suspensión, como arcillas, limos, coloides orgánicos, plancton y otros organismos microscópicos dan lugar a la turbidez del agua. Estas partículas de dimensiones variables (desde 10 μm hasta 0,1 mm de diámetro) se pueden asociar a 3 categorías: minerales, partículas orgánicas húmicas (provenientes de la descomposición de restos vegetales), y partículas filamentosas (por ejemplo, restos de amiantos). Las primeras provienen de la erosión de suelos y rocas, suelen estar revestidas de restos orgánicos, y forman parte de la fracción mayor de las materias en suspensión de la mayoría de las aguas naturales. Los aportes de aguas turbias de escorrentía en épocas de lluvias ricas en materiales minerales causan un aumento en la turbidez de las aguas de ríos y embales. Las algas en época de floración pueden provocar importantes incrementos en la turbidez de los recursos hídricos naturales.

Desde el punto de vista del agua destinada al consumo humano, valores altos de turbidez se suelen correlacionar con la aparición de bacterias y virus. Por otro lado, los compuestos orgánicos productores de turbidez poseen un notable efecto absorbente sobre los posibles plaguicidas existentes en el agua, dificultando

así su eliminación, además de formar quelatos con metales produciendo el mismo efecto.

En aguas naturales, la turbidez suele evolucionar en concordancia con el aporte de aguas provenientes de escorrentías al medio, a su vez provocada por la existencia de precipitaciones, especialmente si estas son torrenciales, o se producen en terrenos fácilmente erosionables. Si el medio hídrico es lo suficientemente profundo, los fenómenos de sedimentación natural provocan un descenso del valor de turbidez con un efecto dilatado respecto al término de los períodos de lluvias. En embalses y lagos, el período de mezcla (invierno-primavera) viene caracterizado por alta turbidez en toda la columna de agua, mientras que durante la estratificación térmica (verano-otoño), las aguas superficiales presentan una baja turbidez, parámetro que va en incremento con la profundidad del cuerpo de agua.

Cuando se trata de aguas residuales, ya sean domésticas o industriales, estas presentan altos valores de turbidez motivados por el contenido de diferentes sustancias en suspensión, en gran medida de carácter orgánico, que estas aguas albergan ⁽⁵⁾.

Método empleado para su determinación: Método Nefelométrico para la determinación de turbidez (APHA 2130-B): se basa en una comparación de la intensidad de la luz dispersada por la muestra en condiciones definidas con la intensidad de la luz dispersada por una suspensión estándar de referencia en las mismas condiciones. Cuanto mayor sea la intensidad de la luz dispersada, mayor será la turbiedad. El polímero de formazina se utiliza como la suspensión de referencia estándar primaria. La turbidez de una concentración especificada de suspensión de formazina se define como 4000 UNT (Unidad Nefelométrica de Turbiedad). Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 61.

La turbidez se puede determinar para cualquier muestra de agua que esté libre de residuos y sedimentación rápida de partículas gruesas. Material de vidrio sucio y la presencia de burbujas de aire dan falsos resultados. El "color verdadero", es decir, el color del agua debido a las sustancias disueltas que absorben la luz, causa que las mediciones de turbidez sean bajas. Este efecto generalmente no es

significativo en el agua tratada ⁽⁶⁾. La Resolución Provincial N° 174/16 “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida de Córdoba”, expresa como criterio de calidad para el agua de bebida de suministro público un valor de 1 UNT como límite aconsejable, y de 2 UNT como límite tolerable.

b. Color:

El color de un agua se debe, fundamentalmente, a diferentes sustancias coloreadas que se encuentran suspendidas o disueltas en ella. En aguas naturales, el color proviene de numerosas materias orgánicas procedentes de la descomposición de vegetales, así como de diversos productos y metabolitos orgánicos que habitualmente se encuentran en ellas. Además, la presencia de sales solubles como hierro y manganeso, encontrados en aguas subterráneas y superficiales con poca oxigenación, también confieren cierta coloración al agua.

En las aguas naturales de los lagos y embalses, el color del agua profunda durante la época de estratificación térmica es marcadamente más alto al del agua superficial. Por otro lado, las coloraciones rojizas observadas a veces en el agua de bebida provienen del hierro, y las negras del manganeso, ambos divalentes, que se oxidan por la adición de cloro u otros agentes oxidantes, generándose la correspondiente precipitación de los hidróxidos óxidos coloreados poco solubles. Otras veces, el color puede deberse a la oxidación de las instalaciones y cañerías que transportan el agua potable, que si son de cobre provoca coloraciones verde-azuladas. En este sentido, la importancia del color en el agua apta para el consumo humano es fundamentalmente de carácter organoléptico: cuando se toma un agua coloreada, inmediatamente se asocia con un agua no segura y hasta peligrosa para la salud.

Con respecto a las aguas residuales industriales, suelen presentar coloraciones en función de la actividad industrial que desarrollen: fábricas de pasta de papel vuelcan aguas pardas debido a la lignina; los efluentes de los mataderos suelen ser rojizas por la presencia de sangre en ellos; las industrias lácteas y sus derivados vierten efluentes de colores blanquecinos, etc ⁽⁵⁾.

Método empleado para su determinación: Método de Comparación Visual (APHA 2120-B): el color se determina por comparación visual de la muestra con soluciones coloreadas de concentraciones conocidas. La comparación también se puede hacer con discos de vidrio especiales correctamente calibrados. El método platino-cobalto para medir el color es considerado estándar, siendo la unidad de color la producida por 1 mg de platino / L en forma de ion cloroplatinato. La proporción de cobalto/platino se puede variar para que coincida con el tono en casos especiales; la proporción dada a continuación es generalmente satisfactoria para igualar el color de las aguas naturales.

El método de platino-cobalto es útil para medir el color del agua potable y de agua en la que el color se debe a materiales naturales. No es aplicable a la mayoría residuos industriales altamente coloreados. Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 67.

El valor del color del agua es extremadamente dependiente del pH y aumenta invariablemente a medida que el pH del agua aumenta. Al informar un valor de color, debe además especificar el pH al que se determina el color. La Resolución Provincial N° 174/16 "Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida de Córdoba", expresa como criterio de calidad para el agua de bebida de suministro público un valor de 15 UC (Unidades de Color) como límite tolerable ⁽⁷⁾.

c. Fitoplancton:

El término "plancton" se refiere a aquellas formas acuáticas microscópicas que tienen poca o ninguna resistencia a las corrientes y al vivir libres flotando y suspendidas en aguas naturales. Plantas planctónicas, "fitoplancton" y los animales planctónicos, "zooplancton" son alcanzados por esta denominación.

El fitoplancton (algas microscópicas) se presenta como formas unicelulares, coloniales o filamentosas. Muchos son fotosintéticos y son rodeados por zooplancton y otros organismos acuáticos. El zooplancton en agua dulce comprende principalmente protozoos, rotíferos, cladóceros y copépodos; una mayor variedad de organismos se produce en aguas marinas.

El plancton, particularmente el fitoplancton, se ha utilizado durante mucho tiempo como indicadores de la calidad del agua. Algunas especies florecen en aguas altamente eutróficas, mientras que otras son muy sensibles a los residuos orgánicos y/o químicos. Algunas especies desarrollan brotes nocivos, a veces generando sabores y olores ofensivos, o condiciones anóxicas o tóxicas que causan muertes de animales o enfermedades humanas.

El ensamblaje de especies de fitoplancton y zooplancton también puede ser útil para evaluar la calidad del agua.

Debido a sus cortos ciclos de vida, el plancton responde rápidamente a los cambios ambientales, y, por lo tanto, es más probable que su cultivo in-vivo y la composición de las especies indiquen la calidad de la masa de agua en la que se encuentran. Influyen fuertemente ciertos aspectos no biológicos de la calidad del agua (como pH, color, sabor y olor) y, en un sentido muy práctico, forman parte de la calidad del agua. Ciertos taxones a menudo son útiles para determinar el origen o la historia reciente de una determinada masa de agua. Sin embargo, debido a su naturaleza transitoria y, a menudo, su distribución irregular, la utilidad del plancton como indicador de calidad del agua pueden ser limitada. La información sobre el plancton como indicadores se interpreta mejor en conjunción con datos biológicos y fisicoquímicos colectivamente concurrentes. Los organismos planctónicos predominan en los estanques, lagos y océanos. El potamoplancton está compuesto por microorganismos tanto animales y vegetales que se desarrolla en grandes ríos con aguas de lento movimiento que se aproximan a las condiciones lénticas, como lo son los géneros *Navicula* y *Nitzschia*, entre otros, que forman parte del ecosistema del Río IV, provincia de Córdoba ⁽⁸⁾. Ya que su origen puede ser incierto y la duración de su exposición a contaminantes desconocidos, el plancton generalmente es menos valioso como indicadores de calidad del agua en ambientes lóticos que en lénticos ⁽⁹⁾.

Desde el punto de vista sanitario, los componentes del fitoplancton de mayor relevancia son las cianobacterias. Éstas están ampliamente extendidas y presentes en diversos tipos de medios, incluidos los suelos, el agua de mar y, de forma destacada, en medios dulceacuícolas. Algunas condiciones medioambientales, como la luz solar, las temperaturas cálidas, la baja turbulencia y las altas concentraciones de nutrientes, pueden favorecer su proliferación excesiva, lo que

a veces se conoce como “floraciones” o “blooms”. Ésta puede ocasionar, en función de la especie, una coloración verdosa del agua por la alta densidad de células suspendidas o, en algunos casos, la formación de capas superficiales de verdín. Esta eutrofización consecuentemente favorece la aparición de floraciones de cianobacterias.

Las cianobacterias proliferan en lagos, embalses, lagunas y ríos con poca corriente. La presencia de cianobacterias en los cuerpos de agua produce dos tipos de problemas: proliferaciones indeseadas, con consecuencias de muy diversa índole, obstrucción de conducciones, colapso vital por agotamiento de oxígeno, proliferaciones de bacterias que usan como sustrato la biomasa generada, entre otros. Estos fenómenos son actualmente muy frecuentes debido al creciente enriquecimiento en nutrientes de todos nuestros acuíferos, que se constituyen en un medio de cultivo muy apropiado para organismos de tipo fotoautótrofo, con unos requerimientos nutricionales muy bajos.

El segundo problema que puede originar el fitoplancton es consecuencia del primero, que es la presencia de toxinas. La existencia de las mismas y el aumento de su concentración en los cuerpos de agua son el resultado de la colonización de los mismos, y la afectación irreversible de los medios naturales de dicho cuerpo de agua para balancear el ecosistema, debido a la naturaleza soluble de estos compuestos y su consiguiente dificultad de eliminarlos posteriormente durante los procesos de potabilización.

Si bien las cianobacterias no son infecciosas, ya que no proliferan en el organismo humano, muchas de ellas producen toxinas potentes y perjudiciales para la salud, denominadas cianotoxinas. Éstas, a diferencia de las cianobacterias, suelen ser no volátiles y altamente estables y resistentes a oxidantes comunes ⁽¹⁰⁾. Aunque se han descubierto unas cuantas toxinas, puede haber otras aún desconocidas. Una medida de control importante es evitar en lo posible la posibilidad de extraer agua que contenga algas tóxicas mediante su detección o ubicación y el diseño de la toma de agua, así como la gestión de la toma de agua y monitoreo eficaces.

Cada cianotoxina tiene propiedades específicas, y algunos de sus efectos perjudiciales específicos son daños hepáticos, neurotoxicidad y oncogenia. Algunos síntomas agudos notificados tras la exposición son: trastornos digestivos,

fiebre e irritaciones de la piel, los oídos, los ojos, la garganta y el aparato respiratorio.

Dependiendo la especie y condiciones ecológicas, estos organismos pueden producir diferentes toxinas, con diferentes consecuencias para el organismo, a saber:

- Microcistinas y nodularinas (hepatotoxinas)
- cianotoxinas, anatoxinas y saxitoxinas (neurotoxinas)
- cilindrospermopsinas (citotoxinas)
- aplisiatoxinas (dermatotoxinas)
- lipopolisacáridos presentes en las algas con efectos irritantes o inflamatorios sobre diversos tejidos.

Producen hepatotoxinas diversas especies de los géneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis* y *Umezakia*. Las cianotoxinas que se producen con mayor frecuencia en concentraciones altas (>1µg/L) son, al parecer, las microcistinas (oligopéptidos) y la cilindrospermopsina (un alcaloide), mientras que las neurotoxinas de cianobacterias sólo se acumulan, al parecer, en concentraciones altas ocasionalmente.

La exposición a estas toxinas por ingestión de agua de consumo, durante la práctica de actividades recreativas, al ducharse y posiblemente, por el consumo de comprimidos de complementos alimenticios elaborados con algas, podría ser peligrosa para la salud. El principal peligro de muchas de las cianotoxinas es la exposición repetida o crónica; no obstante, en algunos casos es más importante la toxicidad aguda (por ejemplo, en el caso de las lyngbyatoxinas, y las neurotoxinas saxitoxina y anatoxina). Han fallecido personas por el uso en diálisis renal de agua tratada inadecuadamente que contenía concentraciones altas de cianotoxinas. La exposición dérmica puede producir irritaciones de la piel y de las mucosas, así como reacciones alérgicas.

Este es un problema creciente en los países del área mediterránea, encontrándose numerosas referencias de muertes por toxicidad procedente de cianobacterias tanto de la fauna del cuerpo de agua en el que se detecta el afloramiento, como también de especies que toman el recurso hídrico de este, como es el caso del ganado ⁽¹¹⁾.

Cuando de seres humanos se trata, existen numerosos casos documentados de afecciones producidas por el contacto directo o indirecto con estas especies de algas, y las toxinas que ellas producen, que van desde afecciones dérmicas en pacientes aislados que tomaron contacto con los cuerpos de agua colonizados por ellas, hasta casos muy significativos, debido a su complejidad, cantidad de pacientes afectados y condiciones particulares, como lo fue el caso del fallecimiento de numerosos pacientes sometidos a diálisis en Brasil, y se sospecha que algo parecido ocurrió en España, donde se dio esta situación en La Estanca de Alcañiz (Teruel), que aprovisiona de agua a varios pueblos que tuvieron que buscar fuente alternativa de agua ⁽¹²⁾.

Dada la eficacia aparentemente alta de algunos de los procesos utilizados en la eliminación tanto de microorganismos como de sustancias químicas (sobre todo de la destilación y de la ósmosis inversa), estos procesos pueden utilizarse como tratamientos únicos o combinados sólo con la administración de una concentración baja de desinfectante residual. No obstante, la ausencia de barreras múltiples dificulta en gran medida la operación permanentemente segura de este proceso y hace que incluso una disminución de la eficacia de corta duración de alguna de las barreras implementadas pueda hacer aumentar el riesgo para la salud de las personas. Esto a su vez, supone la necesidad de aplicar un sistema de monitoreo en línea vinculado a un sistema de intervención rápida de los responsables. Diversas medidas de protección de los recursos y gestión de las fuentes criteriosamente combinadas permiten reducir la probabilidad de que se produzcan floraciones, y algunos métodos de tratamiento, como la filtración y cloración, permiten eliminar las cianobacterias y las cianotoxinas. La filtración puede eliminar eficazmente las células de cianobacterias y, simultáneamente, con frecuencia, una proporción alta de las toxinas. La oxidación con ozono o cloro, aplicando concentraciones y tiempos de contacto suficientemente altos, puede eliminar eficazmente la mayoría de las cianotoxinas disueltas en el agua.

De todas ellas, las microcistinas son las toxinas más frecuentes. Esto supone un problema serio cuando el agua de embalse se destina a consumo humano o recreativo, como es el caso de los embalses en la provincia de Córdoba, estableciéndose un valor guía por la Organización Mundial de la Salud de 1 µg/L en el agua de consumo de microcistina L-R. Esta última es considerada como la variante más tóxica en base en cuatro criterios: los efectos sobre la salud humana, su ocurrencia en cuerpos de agua, la susceptibilidad a los tratamientos en las plantas potabilizadoras, y la estabilidad de la toxina.

Al ser Microcistina L-R una de las toxinas de mayor concentración y distribución en los cuerpos de agua eutrofizados, representa un altísimo riesgo para quienes tengan participación en estos ecosistemas. Además, esta toxina tiene 3 diferentes efectos sobre la salud humana conocidos: hepatotoxicosis aguda, necrosis hepática en pocas horas o días cuando son administradas en dosis letales; daño hepático debido a exposición subcrónica y crónica hacia la toxina; y como consecuencia de esta última, mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis a nivel hepático, con aumento de los defectos congénitos en los primeros meses de embarazo. Debido a su alta estabilidad (siendo destruidas por hidrólisis enzimática, pH extremo o temperaturas de 300° C), y la dificultad de eliminarla mediante tratamientos convencionales como coagulación, floculación, o filtración, se requiere la aplicación varias etapas, combinando las anteriormente nombradas con procesos de mayor especificidad, como la filtración con carbón activado, oxidación por adición de Cl⁺ o exposición a ozono ^(13, 14, 15).

Los factores ambientales en los que una cianobacteria pasa a expresar toxinas es uno de los aspectos más estudiados por los especialistas, pero dista mucho de estar claro. Al parecer, las altas temperaturas, alta luminosidad, poco viento (es decir, aguas tranquilas y no aireadas), además de disponibilidad de nitrógeno y fósforo, podrían ser los factores implicados en que una determinada especie se transforme en tóxica, dando lugar a grandes problemas cuando estas proliferaciones y liberaciones de toxinas se producen en agua para uso urbano o ganadero.

Mediante el análisis químico de la presencia de cianotoxinas se calculan valores de referencia cuando hay datos suficientes y su función primordial es el establecimiento de objetivos de las medidas de control. Es útil para evaluar la eficacia de las estrategias de tratamiento y preventivas, es decir, como forma de

validación de las medidas de control contempladas en un plan de seguridad del agua, pero no es el método preferible para el monitoreo sistemático. En cambio, se recomienda como método de detección de cianotoxinas, aunque indirecto, el monitoreo de signos de floración, o del potencial de desarrollo de floraciones, en el agua de origen, y el incremento de la vigilancia cuando se detectan tales signos. El análisis de las cianotoxinas exige tiempo, equipo y conocimientos, y el análisis cuantitativo de algunas de ellas se ve obstaculizado por la falta de patrones analíticos. No obstante, han comenzado a comercializarse métodos rápidos, como el ELISA y los análisis enzimáticos, para unas pocas cianotoxinas, como las microcistinas.

Las microcistinas son las toxinas más frecuentes. Esto supone un problema serio cuando el agua de embalse se destina a consumo humano o recreativo, estableciéndose un valor de referencia provisional para la microcistina L-R, que cumple los criterios de inclusión. La microcistina L-R es una de las más tóxicas de entre las más de 70 variantes estructurales de microcistina. Aunque es, al parecer, una de las microcistinas más abundantes en todo el mundo, en muchas regiones no es la variante más común, y es probable que las otras sean menos tóxicas. El valor de referencia provisional correspondiente a la microcistina L-R puede utilizarse como sustituto más conservador para la evaluación de tales microcistinas y para el establecimiento de objetivos. En Chorus y Bartram (1999) se describe de forma más pormenorizada el uso de “equivalentes de concentración” o de “equivalentes de toxicidad” para comparar las microcistinas con la microcistina L-R, como lo detalla la Tabla 1:

Valores de referencia correspondientes a cianotoxinas cuya presencia en el agua de consumo puede afectar a la salud		
	Valor de referencia ^a (µg/L)	Observaciones
L-R	1 (P)	Para microcistina L-R total (suma de la libre y la intracelular)

^a P = valor de referencia provisional, dado que hay evidencia de que la sustancia es peligrosa, pero hay escasa información disponible relativa a sus efectos sobre la salud.

Tabla 1: Equivalentes de toxicidad correspondientes a cianotoxinas cuya presencia en el agua de consumo puede afectar a la salud

(16)

Las floraciones de cianobacterias y de otras algas en embalses y aguas fluviales pueden además dificultar la coagulación y la filtración, lo que hace que el agua presente coloración y turbidez después de la filtración. También pueden generar geosmina, 2-metil-isoborneol y otras sustancias químicas que presentan umbrales gustativos en el agua de consumo de unos pocos nanogramos por litro. Algunas sustancias producidas por las cianobacterias (cianotoxinas) también tienen repercusión directa en la salud ⁽⁹⁾.

La Organización Mundial de la Salud ha fijado un valor guía de 1 µg/L de microcistina L-R en el agua de consumo.

Método empleado para su determinación: Determinación de Fitoplancton (APHA 10200 A-F):

Filtración de membrana: este método permite el uso de un gran aumento para enumerar plánctones pequeños, Incluidos flagelados y cianobacterias. Sin embargo, formas delicadas como los flagelados "desnudos" se dañan incluso por filtración suave. Cuando las poblaciones son densas y el contenido de detritos es alto, el filtro se obstruye rápidamente y el cieno puede aplastar a los organismos u oscurecerlos de la vista.

Vierta un volumen medido de muestra bien mezclada en un embudo equipado con un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm . Aplique un vacío de menos de 50 kPa al filtro hasta que aproximadamente 0,5 cm de la muestra permanezca en el filtro. Rompa el vacío, luego aplique bajo vacío (aproximadamente 12 kPa) para eliminar el agua restante pero no secar el filtro.

Para muestras con un bajo contenido de fitoplancton y limo, el método no requiere conteo de plancton individuales para reunir datos de enumeración y aumenta la probabilidad de observar formas menos abundantes. Las muestras también pueden concentrarse en un filtro, invertirse en un portaobjetos de microscopio, y congelado rápidamente, lo que permite la eliminación del filtro y la transferencia de plancton al portaobjetos.

Coloque una gota de medio de montaje en el centro de un portaobjetos etiquetado. Utilice portaobjetos de 25 por 75 mm con extremos esmerilados. El uso de un medio de montaje microscópico adecuado de alto índice de refracción asegura soportes permanentes de fácil manejo para examen bajo inmersión en aceite. Calentar el preparado hasta cerca de los 90° C durante 1 a 2 minutos antes de aplicar el cubreobjetos caliente con su residuo de muestra para acelerar la evaporación del solvente en el medio de montaje. Retire el preparado a una superficie fría y enfríelo durante 5 a 10 segundos, aplique una presión firme pero suave sobre el vidrio de la cubierta con un instrumento amplio y plano.

Para enumerar el plancton, use una celda o cámara de conteo que limite el volumen y el área para chequear el cálculo de densidades de población.

La magnificación es importante en la identificación y enumeración del fitoplancton. A pesar de que los aumentos de 100x a 200x son útiles para contar grandes organismos o colonias, a menudo se requieren magnificaciones mucho mayores. Es útil categorizar técnicas para el fitoplancton contando según las ampliaciones previstas.

Un dispositivo comúnmente utilizado para el conteo de plancton es la celda Sedgwick-Rafter (S-R). Este dispositivo se caracteriza por su fácil manipulación y proporciona datos razonablemente reproducibles cuando se utilizan con un microscopio calibrado equipado con un ocular de medición dispositivo como la rejilla de Whipple. La mayor desventaja asociada con la celda es que los objetivos que

proporcionan alta magnificación no se pueden utilizar. Como resultado, la celda S-R no es apropiada para examinar nanoplancton. La celda S-R tiene aproximadamente 50 mm de largo por 20 mm de ancho por 1 mm de profundidad. El área total de la parte inferior es de aproximadamente 1000 mm² y el volumen total es de aproximadamente 1000 mm³ o 1 mL. Verifique cuidadosamente la longitud y profundidad exactas de la celda con un micrómetro y calibrado antes de su uso.

Llenado de la celda: antes de llenar la celda S-R con una muestra, coloque la tapa de vidrio en diagonal a través de la celda y transfiera la muestra con una pipeta de gran calibre. Coloque la tapa deslizante ayudando a prevenir la formación de burbujas de aire en las esquinas de las celdas. El deslizamiento de la cubierta a menudo se gira lentamente para cubrir la parte interior de la celda S-R durante el llenado. No llene en exceso porque esto produciría una profundidad superior a 1 mm y produciría un conteo no válido. No permita grandes espacios de aire causados por la evaporación que pueden desarrollarse en la cámara durante un examen prolongado. Para evitar la formación de espacios de aire, ocasionalmente coloque una pequeña gota de agua destilada en el borde de vidrio de protección.

Antes de contar, deje que la celda S-R repose al menos 15 minutos para asentar el plancton. Cuente el plancton en la parte inferior de la celda S-R. Algunos fitoplánctones, en particular algas verde-azuladas o flagelados motiles en muestras no conservadas, pueden no asentarse sino subir a la parte inferior del cubreobjetos. Cuando esto ocurra, cuente estos organismos y sume el total de los contados en el fondo de la celda para derivar el número total de organismos. Contar algas en tiras o campos ⁽⁹⁾.

Si bien la Resolución Provincial N° 174/16 “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida de Córdoba” no fija límites tolerables para la aparición de fitoplancton, en la última versión de la misma se ha incluido estableciéndolo como parámetro de aceptación para el agua apta para consumo humano a la “ausencia de fitoplancton en 10 L de muestra” ⁽¹⁷⁾.

Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 71.

d. Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) o Bacterias Heterótrofas:

En este grupo se incluyen todos los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas del recurso, la forma como fue tratada, y las condiciones sanitarias en las que se encuentra la red de distribución. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, un recuento elevado puede significar:

- Excesiva contaminación del agua
- Deficiente manipulación durante el proceso de potabilización
- La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos
- La inmediata alteración del recurso

En el uso o la interpretación del recuento de microorganismo aerobios mesófilos hay ciertos factores que deben ser tenidos en cuenta: Este recuento es sólo de microorganismos vivos ⁽¹⁸⁾.

El recuento de colonias puede emplearse para evaluar el contenido bacteriano general del agua.

Cabe aclarar que esto no representa el número total de microorganismos presentes, sino aquellos que tienen capacidad de formar colonias visibles en medios nutritivos bajo ciertas condiciones.

No debe considerarse esencial para evaluar la inocuidad de los abastecimientos de agua, pero un incremento repentino en el recuento de colonias

en una fuente de aguas subterráneas puede ser un primer indicio de contaminación del acuífero.

Es útil además para evaluar la eficiencia de los sistemas de tratamiento y el grado de limpieza e integridad del sistema de distribución ⁽¹⁹⁾.

Método empleado para su determinación: Recuento de Bacterias Heterótrofas por el Método de Placa Vertida (9215-B): El recuento de placas heterotróficas (HPC), anteriormente conocido como el recuento de placas estándar, es un procedimiento para estimar el número de bacterias heterótrofas vivas en el agua y medir las variaciones durante el tratamiento y distribución del agua o en piscinas. Las colonias pueden surgir de pares, cadenas, grupos o células individuales, todos los cuales están incluidos en el término "Unidades Formadoras de Colonias" (UFC).

El conteo final también depende de la interacción entre las colonias en desarrollo; conviene elegir la combinación de procedimiento y medio que produce el mayor número de colonias dentro del tiempo de incubación designado. Para comparar datos, utilice el mismo procedimiento y medio.

Se describen tres métodos diferentes:

a. Método de placa vertida (9215B): este método es simple de realizar y puede acomodar volúmenes de muestra o muestra diluida que van desde 0,1 a 2,0 mL. Las colonias que crecen mediante este método son relativamente pequeños y compactos, mostrando menos tendencia a invadirse que los producidos por el crecimiento superficial. Por otro lado, las colonias sumergidas a menudo tienen crecimiento más lento y son difíciles de transferir. Un baño de agua con control termostático es esencial para el templado del agar, pero, aun así, puede ocurrir un choque térmico significativo a las bacterias por la exposición transitoria de la muestra a los 45 a 46 ° C que se encuentra el agar al momento de su plaqueo.

b. Método de placa extendida (9215C): este método no causa choque térmico y todas las colonias están en la superficie del agar, donde se pueden distinguir fácilmente de las partículas y las burbujas. Las colonias se pueden

transferir rápidamente, y la morfología de las colonias se puede discernir fácilmente y comparar con las descripciones publicadas. Sin embargo, este método está limitado por el pequeño volumen de muestra o muestra diluida que puede ser absorbida por el agar: 0,1 a 0,5 mL, dependiendo del grado en que las placas previamente vertidas se hayan secado. Para utilizar este procedimiento, mantenga un suministro de placas de agar absorbentes y desecadas adecuadas.

c. Método por filtración por membrana (9215D): este método permite probar grandes volúmenes de agua de baja turbidez y es el método de elección para aguas de bajo conteo (<1 a 10 UFC / mL). Este método no produce choque térmico, pero agrega el gasto del filtro de membrana. Otras desventajas incluyen el área de visualización más pequeña, la necesidad de detectar colonias por la luz reflejada contra un fondo blanco si no se usan filtros de colores o manchas de contraste, posibles daños a las células por presiones de filtración excesivas y posibles variaciones en la calidad del filtro de membrana.

Para aplicar cualquiera de estos métodos, se puede utilizar algunos de los siguientes 4 medios de cultivos diferentes:

a. *Agar de recuento en placa, o Plate Count Agar*, por sus siglas en inglés (PCA): utilizado para los métodos de vertido y placa extendida.

b. *m-HPC agar*: este medio rico en nutrientes es utilizado solo para el método de filtro de membrana.

c. *Agar R2A*: se usa para métodos de placa vertida, placa extendida y filtro de membrana. Este agar bajo en nutrientes da conteos más altos que las formulaciones ricas en nutrientes.

d. *Agar NWRI (HPCA)*: se usa para métodos de placa vertida, placa extendida y filtro de membrana. Es probable que este medio bajo en nutrientes produzca recuentos de colonias más altos que los medios con alto contenido de nutrientes. Actualmente no está disponible en forma deshidratada y requiere preparación a partir de los ingredientes básicos; Esto hace que su uso sea menos deseable.

La reglamentación utilizada como referencia para este trabajo de investigación designa como metodología de referencia al método de placa vertida en agar (9215B), por lo que fue éste el método aplicado para el monitoreo de los diferentes puntos de muestreo, en este caso utilizando el agar PCA marca Britania®, Argentina. El límite de tolerancia expresado en la misma reglamentación para este parámetro es de >100 UFC/mL ⁽²⁰⁾.

Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 80.

e. ***Escherichia coli* y Bacterias Coliformes Totales:**

Los Coliformes Totales constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un período de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C.

Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo coliforme forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Se encuentran habitando el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc ⁽²¹⁾.

Escherichia coli pertenece al grupo de los Coliformes Fecales Termotolerantes, es decir, aquellos coliformes totales capaces de fermentar la lactosa a 44 - 45 °C. Es el anaerobio facultativo predominante en el intestino, y parte de la microflora que mantiene la fisiología en el hospedador sano altamente específico de heces humanas y de animales de sangre caliente ⁽²²⁾.

Método para su determinación: detección y enumeración de *E. coli* y Coliformes Totales mediante el método de filtración de membrana (ISO 9308:2000-1; APHA 9222 D):

a. Filtración: se filtra la muestra (o volúmenes mayores) utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm con unidades de filtración estériles como mínima precaución para evitar la contaminación accidental. Considerar que se interrumpe una serie de filtraciones cuando transcurre un intervalo de 30 o más minutos entre la filtración de 2 muestras. Si se produjera una interrupción de este tipo, tratar la filtración siguiente como si fuera una nueva serie y esterilizar los soportes de los filtros de membrana que se estén utilizando.

b. Incubación, diferenciación y recuento: después de efectuar la filtración de la muestra, se coloca la membrana sobre la placa, con medio M-Endo o Agar Endo-LES, asegurando que no quede aire atrapado entre la membrana y el medio, y se incuba a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 2 horas con la tapa hacia arriba.

Posterior a la incubación, examinar los filtros de membrana y contar las colonias que se presenten, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

- contar como presuntivas de *Escherichia coli*, a las colonias moradas oscuro con brillo metálico
- contar como presuntos Coliformes, a las colonias moradas sin brillo metálico.

c. Confirmación: para confirmar colonias presuntivas de coliformes se deben transferir al menos 5 colonias en agar TSA e incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas. Posterior a ello, realizar la prueba del indol.

En caso de la confirmación de *E. coli* ensayar preferiblemente sobre todas, o al menos 5 colonias. Aislar en TSA e incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas. Pasado este tiempo, se realiza la prueba de la oxidasa ⁽²³⁾.

Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 89.

La Resolución Provincial N° 174/16 "Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida de Córdoba" establece como metodología de referencia tanto para la detección de Coliformes Totales y *E. coli* al método de filtración por membrana (9222 D), por lo que fue éste el método aplicado para el

monitoreo de los diferentes puntos de muestreo, utilizando como medio de incubación el agar M-Endo marca Acumedia®, Estados Unidos de Norteamérica. Cabe destacar que también fueron utilizadas las técnicas de Número Más probable (NMP) y Presencia/Ausencia (P/A) para la investigación de estos microorganismos durante etapas tempranas de este ensayo, pero sus resultados no forman parte de este trabajo de investigación. El límite de tolerancia expresado en la misma reglamentación para este parámetro es de Ausencia/100 mL en ambos casos (23,24,25).

f. *Pseudomonas aeruginosa*:

Es una especie bacteriana, morfológicamente un bacilo recto o ligeramente curvado, que miden de 0,5 a 0,8 μm x 1,5 a 3 μm , gramnegativo, oxidasa positiva, aerobio estricto, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Los miembros de este género generalmente son móviles por un flagelo polar, catalasa positiva y no forman esporas. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biofilm o biopelículas que los protege de la fagocitosis de los anticuerpos o del complemento, propiedad que le confiere un aumento en su patogenicidad.

Como resultado de estas características particulares, *P. aeruginosa* es capaz de adaptarse a diferentes nichos ecológicos, incluso donde los nutrientes son escasos. Se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, tanto en suelos, aguas dulces o saladas (puras o contaminadas), como en plantas y animales. Esta especie sobrevive en agua destilada y agua desionizada, además, puede encontrarse tanto en ambientes oligotróficos como en ambientes con alto número de nutrientes, como en aguas residuales.

Entre los mecanismos de infección, virulencia y resistencia se encuentran: su único flagelo y numerosos pilis que le permiten la adherencia a superficies, la secreción del polisacárido extracelular alginato, la formación de biofilm, el mecanismo de comunicación celular, la secreción de exoenzimas por el sistema de secreción tipo III (TTSS por sus siglas en inglés), los mecanismos de resistencia antimicrobiana y otros factores de virulencia tales como proteasas y elastasas. Por su gran adaptación fisiológica, su potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es causa frecuente de severas infecciones en el ambiente hospitalario a nivel mundial, por lo que se considera como uno de los más importantes patógenos

oportunistas emergentes. Su presencia en agua potable está más relacionada con la capacidad de colonizar biofilms o biopelículas en las tuberías.

Los microorganismos de esta especie son ubicuos en el ambiente. Su presencia es común en suelos y en agua naturales como lagos y ríos en concentraciones desde 10/100 mL hasta > 1000/100 mL, sin embargo, no es frecuente en agua potable y se detecta en ella en bajas concentraciones. *P. aeruginosa* afecta a las industrias y a las redes de distribución de agua por adherirse a las cañerías e instalaciones, ocasionando taponamiento de filtros y alterando la calidad microbiana del agua. Este fenómeno constituye un serio problema para las industrias y redes de abastecimiento de agua dado que algunas cepas de esta especie bacteriana son resistentes a las dosis de cloro recomendadas para desinfectar el agua. Por lo tanto, el método de desinfección utilizado comúnmente, en el cual el cloro es el agente antimicrobiano, no es totalmente efectivo en la eliminación de *P. aeruginosa*. Las principales industrias afectadas son las del sector alimenticio dado que la presencia de esta bacteria en las tuberías produce serias alteraciones en sus procesos productivos.

Se la considera como patógeno oportunista de notable importancia y su presencia en el agua para consumo representa un riesgo para la salud de los habitantes, especialmente para la población de riesgo (recién nacidos, infantes, ancianos) e individuos inmunocomprometidos o con fibrosis quística. Esta bacteria tiene la habilidad de causar daños a distintos órganos del cuerpo y con diversos grados de severidad según las características del organismo hospedador. En la mayoría de los casos en que se produce una infección se debe a una pérdida de la integridad de las barreras físicas de defensa del organismo, como la piel o las membranas mucosas, o a la existencia de una deficiencia en el sistema inmune, en general a causa de portar alguna enfermedad.

Tiene la particularidad, además de ser un patógeno invasivo, es decir de diseminarse a través del cuerpo desde un foco de infección. Es un patógeno toxigénico, o sea que genera toxinas que dañan los tejidos del organismo hospedador. En particular, esta especie libera exotoxinas A, capaces de matar células de la persona infectada.

Tres de las enfermedades causadas por esta bacteria que se registran con mayor frecuencia son: septicemia en víctimas con quemaduras severas; infección

pulmonar crónica, en pacientes con fibrosis quística; y queratitis ulcerativa en personas que utilizan lentes de contacto. También puede causar, aunque en menor medida, enfermedades a personas inmunosuprimidas como: neumonía, meningitis, infecciones en el tracto urinario, en el respiratorio y en las heridas quirúrgicas.

Tanto el Código Alimentario Argentino (Ley Nacional N° 18.284) como diversas normas sugeridas por organismos internacionales, como la Organización Mundial de la Salud, establecen que el agua no es apta para consumo humano si se detecta la presencia de esta bacteria en 100 ml de muestra ⁽²⁶⁾.

Método para su determinación: determinación de *Pseudomonas aeruginosa*, según la técnica de filtración por membranas (APHA 9213 E):

Existen actualmente distintas metodologías para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en agua. Entre los métodos cuantitativos más utilizados puede mencionarse el de tubos múltiples (TM), basado en la presunción de que las bacterias se hallan normalmente distribuidas en un medio líquido y la técnica de filtración por membrana (FM). En términos generales, el método de filtración por membrana consiste en hacer pasar un volumen determinado de muestra a través de una membrana filtrante de un poro tal que retenga los microorganismos en estudio (normalmente el tamaño de poro de las membranas filtrantes es de 0,45 µm); la membrana luego se transfiere con una pinza colocando el frente de la misma hacia arriba sobre la superficie de un medio sólido, evitando la formación de burbujas entre ambas.

Para aplicar la técnica de determinación de *P. aeruginosa* por el método de filtración por membrana se deben aplicar 2 etapas: una fase de estimación cuantitativa, en la que se somete a la membrana resultante del proceso de filtrado a la incubación en un agar selectivo para *P. aeruginosa* como lo es el medio original m-PA y los medios modificados, a partir del medio original, con diferentes antibióticos (como kanamicina, ácido nalidíxico, cicloheximida) para aumentar su selectividad.

Una vez concluido el período de incubación, se prosigue con la fase confirmatoria de la técnica, poniendo a prueba la producción de diferentes pigmentos como la piocianina y la fluoresceína. Para ello se realiza un repique de

aquellas colonias con características típicas de *P. aeruginosa* y se siembran en los medios confirmatorios, agares King A y King B, en los que se ve la producción de los pigmentos anteriormente enunciados ⁽²⁷⁾.

Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 102.

La Resolución Provincial N° 174/16 “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida de Córdoba” establece como metodología de referencia para la detección de *P. aeruginosa* al método de filtración por membrana (9213 E), por lo que fue éste el método aplicado para el monitoreo de los diferentes puntos de muestreo, utilizando el agar M-PA-C, marca BBL, Becton, Dickinson y Cia., Estados Unidos de Norteamérica. El límite de tolerancia expresado en la misma reglamentación para este parámetro es de Ausencia/100 mL ⁽¹⁷⁾.

g. Metodología estadística analítica aplicada para el tratamiento de los datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó la herramienta informática InfoStat®, versión 2019. Este software estadístico fue desarrollado en Argentina por el Grupo InfoStat, un equipo de investigadores en Estadística Aplicada.

Los miembros del Grupo InfoStat son docentes de grado y postgrado de Estadística.

El software y la documentación de InfoStat® son el resultado de la participación activa y multidisciplinaria de todos los miembros del Grupo InfoStat, un grupo de docentes investigadores de la Universidad Nacional de Córdoba. InfoStat® se formaliza como proyecto de investigación y desarrollo en 1995 y su primera versión se lanza en 1998 ⁽²⁸⁾.

La correlación lineal es un método estadístico que estudia la relación lineal existente entre dos variables, cuantificando como de relacionadas están. El cálculo de la correlación entre dos variables es independiente del orden o asignación de

cada variable a X e Y , mide únicamente la relación entre ambas sin considerar dependencias ⁽²⁹⁾.

La finalidad de la correlación es examinar la dirección y la fuerza de la asociación entre dos variables cuantitativas. Así conoceremos la intensidad de la relación entre ellas y si, al aumentar el valor de una variable, aumenta o disminuye el valor de la otra variable ⁽²⁸⁾.

A nivel experimental, la correlación se suele emplear cuando ninguna de las variables se ha controlado, simplemente se han medido ambas y se desea saber si están relacionadas. Por norma general, los estudios de correlación lineal preceden a la generación de modelos de regresión lineal. Primero se analiza si ambas variables están correlacionadas y, en caso de estarlo, se procede a generar el modelo de regresión.

Para estudiar la relación lineal existente entre dos variables continuas es necesario disponer de parámetros que permitan cuantificar dicha relación. Uno de estos parámetros es la covarianza, que indica el grado de variación conjunta de dos variables aleatorias.

La covarianza depende de las escalas en que se miden las variables estudiadas, por lo tanto, no es comparable entre distintos pares de variables. Para poder hacer comparaciones se estandariza la covarianza, generando lo que se conoce como coeficientes de correlación. Existen diferentes tipos, de entre los que destacan el coeficiente de Pearson, altamente eficiente cuando se emplean variables cuantitativas que tienen una distribución normal. Es el más sensible a los valores extremos de los tres métodos; Rho (ρ) de Spearman, se emplea cuando los datos son ordinales, de intervalo, o bien cuando no se satisface la condición de normalidad para variables continuas y los datos se pueden transformar a rangos. Es un método no paramétrico; y Tau (τ) de Kendall, es otra alternativa no paramétrica para el estudio de la correlación que trabaja con rangos. Se emplea generalmente cuando se dispone de pocos datos y muchos de ellos ocupan la misma posición en el rango.

Todos ellos varían entre +1 y -1. Siendo +1 una correlación positiva perfecta y -1 una correlación negativa perfecta. Se emplean como medida de fuerza de asociación (tamaño del efecto):

- 0: asociación nula
- 0,3: asociación mediana
- 0,5: asociación moderada
- 0,7: asociación alta
- 0,9: asociación muy alta

Además del valor obtenido para el coeficiente de correlación, es necesario calcular su significancia. Solo si el p-valor es significativo se puede aceptar que existe correlación, y esta será de la magnitud que indique el coeficiente. Por muy cercano que sea el valor del coeficiente de correlación a +1 o -1, si no es significativo, se ha de interpretar que la correlación de ambas variables es 0, ya que el valor observado puede deberse a simple aleatoriedad. En Pearson, si el p-valor es menor a 0,05 ($p < 0,05$) se rechaza la hipótesis nula, es decir que la hipótesis planteada es verdadera; y si el p-valor es igual o mayor a 0,05 ($p \geq 0,05$) no se rechaza la hipótesis nula, por lo que hipótesis planteada puede no ser verdadera, sino deberse al azar.

La correlación lineal entre dos variables, además del valor del coeficiente de correlación y de su significancia, también tiene un tamaño de efecto asociado. Se conoce como coeficiente de determinación R^2 . Se interpreta como la cantidad de varianza de Y explicada por X . En el caso del coeficiente de Pearson, R^2 se obtiene elevando al cuadrado el coeficiente de correlación⁽³¹⁾.

Concretamente, se aplicó para el tratamiento estadístico de los datos el análisis de correlación de Pearson.

I. Coeficiente de Pearson

El coeficiente de correlación de Pearson es la covarianza estandarizada. Es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no

depende de las unidades de medida de las variables originales. Su ecuación difiere dependiendo de si se aplica a una muestra, Coeficiente de Pearson muestral (r), o si se aplica la población Coeficiente de Pearson poblacional (ρ).

El coeficiente de Pearson muestral se define como:

$$r_{xy} = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{(n-1) s_x s_y}$$

$$r_{xy} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}}$$

El coeficiente de correlación muestral representa la covarianza de los valores muestrales estandarizados. Asume valores en el intervalo $[-1;1]$ y el signo indica la dirección de la asociación (valores negativos se producen cuando la tendencia promedio indica que, si un valor en el par observado es más grande que su media, el otro valor es más pequeño que su media) ⁽²⁸⁾.

El coeficiente de Pearson poblacional se define como:

$$\rho_{X,Y} = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y}$$

$$\rho_{X,Y} = \frac{E[(X - \mu_X)(Y - \mu_Y)]}{\sigma_X \sigma_Y}$$

Donde:

- σ_{XY} es la covarianza de X e Y
- σ_X es la desviación estándar de la variable X
- σ_Y es la desviación estándar de la variable Y

(31)

Se amplía sobre esta técnica analítica en la sección de Anexos, página 105.

Exposición y tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Habiendo concluido el período de monitoreo comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018, de los puntos previamente establecidos por el ente regulador del servicio de provisión de agua potable, se continuó con la tabulación de dichos datos y su preparación para el tratamiento estadístico de los mismos.

Los puntos muestreados corresponden a diferentes localidades de la provincia de Córdoba, preestablecidos en el programa de monitoreo hacia los prestadores del servicio de suministro de agua potable para los habitantes de dichas localidades y zonas aledañas, sobre los cuales dicho ente ejerce el poder de control.

Cabe destacar que la variabilidad tanto geográfica de la provincia como climática del período anteriormente enunciado aportan a este análisis una visión integral de la calidad del recurso entregado a los consumidores, pudiendo durante un año completo recolectar muestras, e incluyendo en el estudio realizado el componente de la mencionada diversidad climática.

Los datos recolectados fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de correlación y regresión lineales, buscando la existencia de relación entre los mismos. Esto indicará si existe o no entre las variables alguna relación y dará idea de su naturaleza y de la intensidad de la correspondencia de dicha relación.

El concepto de correlación se refiere al grado de variación conjunta existente entre 2 o más variables. Se puede decir además que la variación es lineal cuando los valores de las variables se modifican de manera similar.

La tabla 2 presentará los resultados de los ensayos realizados en los diferentes puntos designados, en el período anteriormente mencionado.

Tabla 2: Tabla general de datos de los ensayos realizados a las muestras de agua apta para consumo humano correspondiente al monitoreo período del servicio de suministro de agua potable en la provincia de Córdoba, en el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018

Datos de la muestra		Parámetros analizados						
		Físico-químicos		Microbiológicos: recuentos			Biológicos	
Descripción	Fecha de toma de muestra	Turbidez (NTU)	Color (U.C)	Bacterias heterótrofas 30° C (UFC/ mL)	Coliformes Totales (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)	Fitoplancton total (cel/mL)
06_CE_01	03/04/17	0,655	2	52	<1	<1	<1	13
03_BV_01	06/04/17	0,214	2	68	<1	<1	<1	1
16_SD_02	11/04/17	0,701	-	1	<1	<1	<1	13
06_CE_01	15/05/17	1,35	6,5	<1	<1	<1	<1	21
13_VD_01	15/05/17	0,76	-	<1	<1	<1	<1	16
16_SD_02	15/05/17	0,468	-	2	<1	<1	<1	23
11_SM_01	24/05/17	0,251	<0,1	<1	<1	<1	<1	4
03_BV_01	24/05/17	0,248	0,2	<1	<1	<1	<1	2
16_SD_02	16/06/17	0,38	-	<1	<1	<1	<1	19
04_CA_02	16/06/17	0,18	1,4	<1	<1	<1	<1	1
09_RC_02	06/06/17	0,265	2,4	18	<1	<1	<1	4
10_MC_01	16/06/17	0,268	-	<1	<1	<1	<1	59
06_CE_01	16/06/17	0,877	5,4	<1	<1	<1	<1	14

11_SM_01	22/06/17	0,166	0,3	<1	<1	<1	<1	32
03_BV_01	22/06/17	0,405	1,7	<1	<1	<1	<1	4
07_CP_02	21/06/17	0,309	2,3	<1	<1	<1	<1	79
12_TA_01	22/06/17	0,291	2,9	<1	<1	<1	<1	6
18_VH_02	23/06/17	3,06	1,4	<1	<1	<1	<1	22
19_VSC_02	23/06/17	0,602	-	<1	<1	<1	<1	130
16_SD_02	07/07/17	0,641	-	<1	<1	<1	<1	14
06_CE_01	17/07/17	0,87	1,8	<1	<1	<1	<1	88
03_BV_01	20/07/17	0,391	1	<1	<1	<1	<1	124
11_SM_01	20/07/17	0,221	0,4	<1	<1	<1	<1	8
16_SD_02	16/08/17	0,7	-	<1	<1	<1	<1	110
06_CE_01	18/08/17	1,38	5,6	<1	<1	<1	<1	252
13_VD_01	18/08/17	0,468	-	<1	<1	<1	<1	88
03_BV_01	23/08/17	0,29	1	<1	<1	<1	<1	21
11_SM_01	24/08/17	0,199	1,4	<1	<1	<1	<1	19
10_MC_01	29/09/17	0,361	-	<1	<1	<1	<1	207
16_SD_02	27/09/17	0,414	-	<1	<1	<1	<1	17
04_CA_03	27/09/17	0,395	1,6	<1	<1	<1	<1	13
09_RC_02	27/09/17	0,221	2,4	<1	<1	<1	<1	2
11_SM_01	29/09/17	0,215	0,6	1	<1	<1	<1	17
03_BV_01	29/09/17	0,3	1,5	<1	<1	<1	<1	8

14_VH_01	29/09/17	1,11	3,6	<1	<1	<1	<1	123
19_VSC_02	25/09/17	1,89	-	<1	<1	<1	<1	310
13_VD_01	29/09/17	0,71		<1	<1	<1	<1	89
10_MC_01	26/09/17	0,361		<1	<1	<1	<1	207
06_CE_01	29/09/17	1,28	1,9	<1	<1	<1	<1	124
07_CP_02	02/10/17	0,343	2,5	<1	<1	<1	<1	204
12_TA_01	27/09/17	0,341	1	<1	<1	<1	<1	86
02_AR_02	27/09/17	0,222	-	<1	<1	<1	<1	<1
16_SD_02	10/10/17	0,452	-	<1	<1	<1	<1	85
06_CE_01	12/10/17	1,24	2,2	<1	<1	<1	<1	138
13_VD_01	19/10/17	0,591	-	<1	<1	<1	<1	104
17_VDL_02	26/10/17	0,631	5,6	3	<1	<1	2	22000
03_BV_01	27/10/17	0,331	2,7	<1	<1	<1	<1	13
11_SM_01	27/10/17	0,306	3,2	<1	<1	<1	<1	44
03_BV_01	11/12/17	0,174	0,5	<1	<1	<1	<1	9
11_SM_01	11/12/17	0,411	1,6	<1	<1	<1	<1	14
16_SD_02	10/11/17	0,309	-	<1	<1	<1	<1	1
06_CE_01	11/12/17	1,45	6,3	<1	<1	<1	<1	67
13_VD_01	16/11/17	0,651	-	<1	<1	<1	<1	132
18_VH_02	30/11/17	7,69	5,6	<1	<1	<1	<1	-
10_MC_01	21/12/17	0,254	-	<1	<1	<1	<1	64

06_CE_01	06/12/17	2,02	1,9	<1	<1	<1	<1	175
13_VD_01	20/12/2017	0,661	-	<1	<1	<1	<1	60
16_SD_02	07/12/17	0,511	-	<1	<1	<1	<1	145
04_CA_02	07/12/17	0,202	0,8	<1	<1	<1	<1	55
09_RC_02	07/12/17	0,584	1,7	<1	<1	<1	<1	3
11_SM_01	14/12/17	0,212	<0,1	<1	<1	<1	<1	21
03_BV_02	14/12/17	0,517	0,4	<1	<1	<1	<1	15
18_VH_02	21/12/17	0,126	<0,1	<1	<1	<1	<1	29
19_VSC_02	18/12/17	1,56	-	4	<1	<1	<1	105
02_AR_02	29/12/17	0,105	-	<1	<1	<1	<1	1
12_TA_01	22/12/17	0,863	8,7	<1	<1	<1	<1	113
07_CP_02	21/12/17	0,685	12	<1	<1	<1	<1	77
16_SD_02	01/02/18	0,604	-	<1	<1	<1	<1	51
06_CE_01	01/02/18	1,71	1,7	>300	<1	<1	<1	107
13_VD_01	01/02/18	0,824	-	<1	<1	<1	<1	40
11_SM_01	02/02/18	0,185	0,8	<1	<1	<1	<1	5
03_BV_01	01/02/18	0,213	1,3	<1	<1	<1	<1	19
06_CE_01	16/02/18	2,59	28	<1	<1	<1	<1	60
13_VD_01	05/03/18	0,78	-	1	<1	<1	<1	2149
16_SD_02	15/02/18	0,483	-	<1	<1	<1	<1	9
03_BV_01	18/03/18	0,263	1,2	<1	<1	<1	<1	16

11_SM_01	08/03/18	0,229	1,8	<1	<1	<1	<1	32
09_RC_02	15/03/18	0,72	4	1	<1	<1	<1	40
16_SD_02	20/03/18	1,1		<1	<1	<1	<1	22
06_CE_01	16/03/18	1,41	2,2	<1	<1	<1	<1	30
10_MC_01	16/03/18	0,535	-	<1	<1	<1	<1	26
13_VD_01	03/04/18	0,659	-	<1	<1	<1	<1	202
01_AN_01	16/03/18	0,662	-	<1	<1	<1	<1	-
07_CP_01	10/04/18	0,426	5,6	1	<1	<1	<1	65
12_TA_01	04/04/18	1,07	10	5	11	<1	<1	179
11_SM_01	23/03/18	0,179	0,9	<1	<1	<1	<1	2
03_BV_01	23/03/18	0,225	1,3	<1	<1	<1	<1	1
02_AR_02	03/04/18	0,098	-	<1	<1	<1	<1	<1
19_VSC_02	09/04/18	1,6	-	4	<1	<1	<1	315
18_VH_02	15/04/18	53,2	0,8	<1	<1	<1	<1	317
08_CQ_02	05/04/18	29,2	13	1,5 x 10 ²	<1	<1	4	21
05_CC_02	04/05/18	0,197	-	<1	<1	<1	<1	-
15_SC_03	15/05/18	0,113	<0,1	<1	<1	<1	<1	-
02_AR_02	04/05/18	0,214	-	<1	<1	<1	<1	450

Sometiendo los datos presentados en dicha tabla a análisis estadístico mediante coeficiente de correlación lineal de Perarson, se obtiene el análisis presentado en la tabla 3.

Tabla 3: Tabla estadística que detalla los resultados de la aplicación del análisis estadístico de correlación lineal mediante el coeficiente de Pearson

Correlación de Pearson				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson (r)	p-valor
Turbidez (NTU)	Turbidez (NTU)	53	1,00	<0,0001
Turbidez (NTU)	Color (U.C)	53	-0,02	0,8701
Turbidez (NTU)	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	-0,01	0,9623
Turbidez (NTU)	coliformes totales (UFC/10..)	53	-0,01	0,9381
Turbidez (NTU)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	0,00	>0,9999
Turbidez (NTU)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	0,00	>0,9999
Turbidez (NTU)	Fitoplancton total (cel/mL..)	53	0,56	<0,0001
Color (U.C)	Turbidez (NTU)	53	-0,02	0,8701
Color (U.C)	Color (U.C)	53	1,00	<0,0001
Color (U.C)	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	-0,04	0,7640
Color (U.C)	coliformes totales (UFC/10..)	53	0,23	0,0974
Color (U.C)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	0,00	>0,9999
Color (U.C)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	0,00	>0,9999
Color (U.C)	Fitoplancton total (cel/mL..)	53	0,18	0,1900
BAM 30° C (UFC/ mL)	Turbidez (NTU)	53	-0,01	0,9623
BAM 30° C (UFC/ mL)	Color (U.C)	53	-0,04	0,7640
BAM 30° C (UFC/ mL)	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	1,00	<0,0001
BAM 30° C (UFC/ mL)	coliformes totales (UFC/10..)	53	-0,01	0,9541
BAM 30° C (UFC/ mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	0,00	>0,9999
BAM 30° C (UFC/ mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	0,00	>0,9999
BAM 30° C (UFC/ mL)	Fitoplancton total (cel/mL..)	53	0,08	0,5894
coliformes totales (UFC/10..)	Turbidez (NTU)	53	-0,01	0,9381
coliformes totales (UFC/10..)	Color (U.C)	53	0,23	0,0974
coliformes totales (UFC/10..)	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	-0,01	0,9541
coliformes totales (UFC/10..)	coliformes totales (UFC/10..)	53	1,00	<0,0001

coliformes totales (UFC/10..	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	0,00	>0,9999
coliformes totales (UFC/10..	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	0,00	>0,9999
coliformes totales (UFC/10..	Fitoplancton total (cel/mL..	53	0,25	0,0712
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	Turbidez (NTU)	53	0,00	>0,9999
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	Color (U.C)	53	0,00	>0,9999
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	0,00	>0,9999
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	coliformes totales (UFC/10..	53	0,00	>0,9999
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	1,00	<0,0001
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	0,00	>0,9999
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	Fitoplancton total (cel/mL..	53	0,00	>0,9999
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	Turbidez (NTU)	53	0,00	>0,9999
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	Color (U.C)	53	0,00	>0,9999
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	0,00	>0,9999
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	coliformes totales (UFC/10..	53	0,00	>0,9999
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	0,00	>0,9999
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	1,00	<0,0001
<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	Fitoplancton total (cel/mL..	53	0,00	>0,9999
Fitoplancton total (cel/mL..	Turbidez (NTU)	53	0,56	<0,0001
Fitoplancton total (cel/mL..	Color (U.C)	53	0,18	0,1900
Fitoplancton total (cel/mL..	BAM 30° C (UFC/ mL)	53	0,08	0,5894
Fitoplancton total (cel/mL..	coliformes totales (UFC/10..	53	0,25	0,0712
Fitoplancton total (cel/mL..	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	53	0,00	>0,9999
Fitoplancton total (cel/mL..	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)..	53	0,00	>0,9999
Fitoplancton total (cel/mL..	Fitoplancton total (cel/mL..	53	1,00	<0,0001

En la anterior tabla se destaca que existe una relación lineal positiva, aunque pobre, entre la cantidad de fitoplancton presente en las muestras y el color de las mis más ($r = 0,18$). Diferente es el caso de la relación entre la cantidad de fitoplancton presente en las muestras y la turbidez, donde la relación positiva entre ambas variables es más marcada ($r = 0,56$).

Discusiones y Conclusiones

De acuerdo a los datos recogidos durante el tiempo consignado, y luego de la aplicación del análisis estadístico aplicado, surgen las siguientes conclusiones:

- Teniendo en cuenta los parámetros de calidad para el agua destinada al consumo humano establecidos por la Secretaría de Recursos Hídricos de la provincia de Córdoba, reglamentados por la Resolución 174/16: “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida”, se detectaron 11 de un total de 94 muestras que no cumplían en su totalidad con dicho criterio, superando alguno de los límites establecidos por la reglamentación arriba mencionada, como queda plasmado en el siguiente extracto de la Tabla 2, donde se resaltan los valores que superan los límites establecidos por el organismo anteriormente nombrado.

Datos de la muestra		Parámetros analizados						
Descripción	Fecha de toma de muestra	Físico-químicos		Microbiológicos: recuentos			Biológicos	
		Turbidez (NTU)	Color (U.C)	Bacterias heterótrofas 30° C (UFC/ mL)	Coliformes Totales (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)	Fitoplancton total (cel/mL)
06_CE_01	15/05/17	1,35	6,5	<1	<1	<1	<1	21
18_VH_02	23/06/17	3,06	1,4	<1	<1	<1	<1	22
17_VDL_02	26/10/17	0,631	5,6	3	<1	<1	2	22000
06_CE_01	11/12/17	1,45	6,3	<1	<1	<1	<1	67
18_VH_02	30/11/17	7,69	5,6	<1	<1	<1	<1	-
12_TA_01	22/12/17	0,863	8,7	<1	<1	<1	<1	113
06_CE_01	01/02/18	1,71	1,7	>300	<1	<1	<1	107
06_CE_01	16/02/18	2,59	28	<1	<1	<1	<1	60
12_TA_01	04/04/18	1,07	10	5	11	<1	<1	179
18_VH_02	15/04/18	53,2	0,8	<1	<1	<1	<1	317
08_CQ_02	05/04/18	29,2	13	1,5 x 10 ²	<1	<1	4	21

Tabla 2 (extracto): tabla general de datos de los ensayos realizados a las muestras de agua apta para consumo humano correspondiente al monitoreo período del servicio de suministro de agua potable en la provincia de Córdoba, en el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018

- En el anterior extracto de la Tabla 2 queda también en evidencia en su última columna (derecha) que 88 muestras de un total de 94 no cumplen con el parámetro “fitoplancton”, que, si bien no posee un límite

establecido debido a la falta de datos para establecer un valor numérico, la Secretaría de Recursos Hídricos de la provincia de Córdoba, reglamentados por la Resolución 174/16: “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida” sugiere que debe evitarse su presencia. El 94% de las muestras analizadas para este estudio presentaron recuentos positivos de fitoplancton, y en algunos casos peligrosamente elevados. Como se citó anteriormente la presencia de algas puede impactar directamente tanto en las características organolépticas como en la inocuidad del vital recurso.

- **Existe una relación directa entre los parámetros de turbidez y los de fitoplancton demostrados porque el coeficiente de correlación de Pearson mayor a 0,5 ($r = 0,56$; $p\text{-valor} < 0,0001$).** Un aumento en la turbidez de un cuerpo de agua se debe principalmente a sustancias en suspensión a lo largo de la columna, situación que se percibe como turbidez en aguas de rápido movimiento, como en las crecientes abruptas luego de una lluvia intensa. En este caso, los sólidos que se mantenían en suspensión por la turbulencia de las aguas sedimentarán cuando la velocidad de la corriente disminuya. En contraposición, el fitoplancton que forma parte del ecosistema acuático en estudio, posee mecanismos que le permiten permanecer en suspensión, lo más cercano a la superficie posible, para poder captar la energía solar necesaria para sus procesos metabólicos, por lo que seguirán en suspensión aun cuando el movimiento del agua se haya detenido, dispersando los haces de luz que atraviesan la superficie del agua, generando el fenómeno de turbidez, viéndose positivamente afectada según el número de microorganismos presentes en el cuerpo de agua estudiado.

- **Además de la turbidez, existe aumento del parámetro “color” al haber presencia de algas (fitoplancton).** Este fenómeno queda en evidencia en los resultados del análisis estadístico, el que arrojó una potencial relación entre estos dos parámetros que, si bien parece no ser lineal, es más significativa que con las demás variables estudiadas ($r = 0,18$; $p\text{-valor} < 0,1900$). Esta relación puede deberse en parte a la pigmentación que estos microorganismos poseen que, en conjunción con la cantidad de estos presentes en el cuerpo de agua estudiado, podrían absorber y dispersar la luz que toma contacto con este, otorgándole al mismo diferentes tonalidades, alejadas del color verdadero del reservorio en ausencia de colonias de estos diminutos organismos.

- **No existe relación entre valores elevados de color y presencia de bacterias.** Esto puede deberse a que, a diferencia del fitoplancton, las bacterias emplean otros mecanismos metabólicos diferentes de la fotosíntesis para la captación de energía, por lo que su pigmentación es muy débil, además de su escaso número en comparación con los organismos fitoplanctónicos, debido a la alta competencia por los nutrientes disponibles en el ecosistema acuático en estudio.

- **Se observa que todas las curvas de turbidez tienen un apreciado aumento a medida que sobrevienen los meses cálidos.** Esto puede explicarse por los fenómenos de afloramientos o “blooms” producidos en las mencionadas épocas del año, cuando los microorganismos fitoplanctónicos logran la mayor exposición a la luz solar, asociado además con un aumento de la temperatura superficial del cuerpo de agua, y a un mayor aporte de materia orgánica de todo el ecosistema por un aumento en la actividad metabólica de todas las especies intervinientes en el mismo. A continuación, en el extracto de la Tabla 2, donde a valores similares de turbidez, se registran valores significativos de color cuando se detectan recuentos considerables de células

fitoplanctónicas. En estos casos, el aumento del color en las muestras puede deberse a las diferentes especies presentes con pigmentación hidrosoluble; mientras que la turbidez aumenta en todos los casos al detectarse fitoplancton, debido a la dependencia de este parámetro al material particulado en suspensión:

Datos de la muestra		Parámetros analizados						
		Físico-químicos		Microbiológicos: recuentos				Biológicos
Descripción	Fecha de toma de muestra	Turbidez (NTU)	Color (U.C)	Bacterias heterótrofas 30° C (UFC/mL)	Coliformes Totales (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)	Fitoplancton total (cel/mL)
07_CP_02	21/06/17	0,309	2,3	<1	<1	<1	<1	79
07_CP_02	02/10/17	0,343	2,5	<1	<1	<1	<1	204
16_SD_02	15/05/17	0,468	-	2	<1	<1	<1	23
16_SD_02	07/12/17	0,511	-	<1	<1	<1	<1	145
19_VSC_02	23/06/17	0,602	-	<1	<1	<1	<1	130
19_VSC_02	25/09/17	1,89	-	<1	<1	<1	<1	310

Tabla 2 (extracto): *tabla general de datos de los ensayos realizados a las muestras de agua apta para consumo humano correspondiente al monitoreo período del servicio de suministro de agua potable en la provincia de Córdoba, en el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018*

- **A su vez concuerda que la turbidez se ve más afectada en aquellos puntos en los que el origen de la fuente de agua es de curso superficial con respecto a aquellos que se captan de acueductos o pozos.** Esto se debe, como ya se mencionó anteriormente, a la necesidad que tienen los organismos fitoplanctónicos de estar expuestos a la luz solar para captar energía. Además, la disponibilidad de oxígeno tanto en acueductos cerrados como en depósitos naturales de agua subterránea es muy baja, otro factor que atenta contra el normal desarrollo del fitoplancton. Además, las aguas superficiales reciben todo el aporte de los residuos generado por la actividad antropogénica y aquellos provenientes de la escorrentía durante las lluvias lo que aumenta considerablemente la materia orgánica disponible en el reservorio de agua y por ende la posibilidad de reproducción de manera indiscriminada de los mencionados organismos.
- **A valores similares de turbidez, cuando se aprecian UC positivas por el método ensayado hay concordancia con la presencia de fitoplancton,** como se observa en el siguiente extracto de la Tabla 2, donde a valores similares de turbidez, se registran valores significativos de color cuando se detectan recuentos considerables de células fitoplanctónicas:

Parámetros analizados							
Físico-químicos	Microbiológicos: recuentos				Biológicos		
Descripción	Turbidez (NTU)	Color (U.C)	BAM 30° C (UFC/mL)	coliformes totales (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/100 mL)	Fitoplancton total (cel/mL)
07_CP_02	0,309	2,3	<1	<1	<1	<1	79
03_BV_01	0,391	1	<1	<1	<1	<1	124
07_CP_02	0,343	2,5	<1	<1	<1	<1	204
12_TA_01	0,341	1	<1	<1	<1	<1	86
11_SM_01	0,306	3,2	<1	<1	<1	<1	44
03_BV_01	0,263	1,2	<1	<1	<1	<1	16
11_SM_01	0,229	1,8	<1	<1	<1	<1	32

Tabla 2 (extracto): *tabla general de datos de los ensayos realizados a las muestras de agua apta para consumo humano correspondiente al monitoreo período del servicio de suministro de agua potable en la provincia de Córdoba, en el período comprendido entre febrero del año 2017 y marzo de 2018*

- Considerándose que el cloro residual siempre fue positivo, teniendo efecto protector sobre las bacterias (organismos procariotas), no se vio el mismo efecto sobre la presencia de algas (organismos eucariotas), por lo que la presencia de cloro no aseguraría en todos los casos la ausencia total de partículas biológicas.** Esto puede deberse a la concentración de cloro residual presente en el agua potabilizada, ya que, según lo expresado en la “Evaluación del uso de cloro y ozono para la remoción de microcistina en agua destinada al consumo” por investigadores del CONICET⁽³⁰⁾, se requieren concentraciones de a partir de 1 mg/L del desinfectante para generar una acción oxidante eficiente sobre el fitoplancton y sus toxinas, valores muy por encima de lo reglamentado en la Resolución 174/16: “Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida”. Además, si bien la utilización de cloro como desinfectante es universal, su eficiencia decae con el cambio de las condiciones del agua al que se lo aplicará, como su temperatura y pH, la cantidad de microorganismos presentes en la misma, y la relación concentración-tiempo de contacto del cloro con el agua a tratar. Particularmente en eventos de floración fitoplanctónica, el pH del agua se mueve hacia la zona alcalina de la escala, disminuyendo así la eficiencia del cloro como barrera de control para los organismos fitoplanctónicos, y haciéndose evidente la necesidad de atacar a estos microorganismos mediante un agente menos susceptible a las características del agua a tratar.
- No pudo establecerse relación alguna entre los parámetros de *E. coli* y *P. aeruginosa* con las variables turbidez, color y fitoplancton.** Como se mencionó anteriormente, las adaptaciones de los organismos fitoplanctónicos a la vida en los ecosistemas acuáticos son más eficientes que las de las bacterias, por lo que compiten por los nutrientes y vencen a estas últimas, proliferando en el medio y otorgándole las características antes mencionadas.

- **Se observó que la presencia de Bacterias Heterótrofas puede ser independiente de la presencia de Coliformes Totales. Asimismo, cuando existen Bacterias Coliformes Totales el aumento de las Bacterias Heterótrofas no es linealmente significativo.** Esto pone de manifiesto que los grupos de microorganismos tienen comportamientos propios y su proliferación depende de características que no son comunes en todos los casos. Si bien las Bacterias Heterótrofas constituyen un grupo de microorganismos ambientales heterogéneo de distribución ubicua en la naturaleza, con diferentes grados de requerimiento tanto de oxígeno como de nutrientes, y que poseen un rango de temperatura de crecimiento variado, que para la técnica aplicada se expusieron las muestras a 30° C incubándola en medios de crecimiento general, y que los microorganismos Coliformes Totales, considerados dentro de los microorganismos indicadores de higiene, constituyen un subgrupo de los primeros, son incubados en condiciones nutricionales más selectivas y de manera de que el contacto con el oxígeno sea reducido, y a temperaturas más elevadas (35° C), son por tanto más exigentes, por lo que es posible que no coincidan en aparición durante la realización de los ensayos.

- **Se observó, además, que la detección de bacterias patógenas como *E. coli* y *P. aeruginosa* no implican un notable incremento de Bacterias Heterótrofas.** Esto podría deberse a que los métodos además de no ser similares en cuanto a exactitud tampoco involucran un tratamiento de muestra significativamente representativas. Al realizarse el ensayo para la determinación del número de Bacterias Heterótrofas presentes en 1 mL no se puede evaluar la misma representatividad para los patógenos cuando estos se investigan en 100 mL de muestra. Además, que aumente o disminuya la carga microbiológica general, como es el caso de las Bacterias Heterótrofas, microorganismos indicadores del estado de higiene de los cuerpos de agua, reservorios y vías de transporte del recurso, no se relaciona directamente con la proliferación de patógenos, y viceversa.

- **La presencia de Bacterias Coliformes Totales no indica necesariamente que la presencia de *E. coli*.** Los microorganismos Coliformes Totales son anaerobios facultativos, de amplia distribución en la naturaleza, encontrados especialmente en suelos, semillas y vegetales y en la superficie de cuerpos de agua dulce, y pueden o no tener origen entérico. La presencia de Coliformes Totales sugiere fallas en la eficacia del tratamiento y la integridad del sistema de distribución y la identificación de las cepas aisladas puede a veces dar una indicación sobre dicho origen. Por el contrario, la presencia de *E. coli*, que es un microorganismo habitante normal del tracto digestivo de animales de sangre caliente y rara vez se encuentra en agua o suelo que no haya sufrido algún tipo de contaminación origen fecal, se lo considera como indicador universal de contaminación de esta proveniencia en diferentes matrices. Este microorganismo genera una alerta ya que su presencia por sí sola puede generar complicaciones sanitarias de variada intensidad en los consumidores, desde gastroenteritis hasta el síndrome urémico hemolítico (SUH) a través de la cepa *E. coli* O157:H7, con consecuencias nocivas para el ser humano. Puede además sugerir la presencia de otros microorganismos altamente patógenos como son la *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Listeria* etc, especies que tampoco se encuentran ligadas a la detección de Bacterias Coliformes Totales.

- **Si bien los pasos intermedios referenciados en los caldos de enriquecimientos y agares selectivos utilizados en las diferentes técnicas de aislamiento de los microorganismos patógenos de estudio para el agua de**

consumo (*E. coli* y *P. aeruginosa*) mostraron crecimiento positivo, las pruebas de confirmación de dichas técnicas arrojan resultados negativos para los mismos microorganismos, incluso en medios de cultivo altamente selectivos como los son los medios cromogénicos. Por lo que, en dichos casos se informó la ausencia de los mismos, debido a la falta de pruebas concluyentes que situaran a estos microorganismos patógenos en las muestras consideradas para este trabajo de investigación. Los caldos de enriquecimiento no permiten aislar de manera eficiente los agentes patógenos como para poder dar un diagnóstico anticipado obviando las etapas propuestas por la norma. Esta evidencia refuerza el concepto de las técnicas de detección de patógenos, las que se deben aplicar de manera completa y siguiendo las instrucciones de dicha norma, para finalmente confirmar la presencia o ausencia de los mismos y no antes, a los fines de evitar falsos positivos.

- Sería conveniente abrir una línea de investigación en la que se pueda detectar la composición y variabilidad de géneros de algas fitoplanctónicas presentes en los distintos reservorios de agua, cuyos pigmentos hidrosolubles pudieran impartir color al agua, o bien interfieran en la absorción de la luz modificando el color verdadero.

Anexos: técnicas analíticas:

Determinación de la turbidez por el Método Nefelométrico (APHA 2130-B):

a. Principio: este método se basa en una comparación de la intensidad de la luz dispersada por la muestra en condiciones definidas con la intensidad de la luz dispersada por una suspensión estándar de referencia en las mismas condiciones. Cuanto mayor sea la intensidad de la luz dispersada, mayor será la turbiedad. El polímero de formazina se utiliza como la suspensión de referencia estándar primaria. La turbidez de una concentración especificada de suspensión de formazina se define como 4000 NTU.

Interferencia: la turbidez se puede determinar para cualquier muestra de agua que esté libre de residuos y sedimentación rápida de partículas gruesas. Material de vidrio sucio y la presencia de burbujas de aire dan falsos resultados. El "color verdadero", es decir, el color del agua debido a las sustancias disueltas que absorben la luz, causa que las mediciones de turbidez sean bajas. Este efecto generalmente no es significativo en el agua tratada.

b. Aparatología: utilice un nefelómetro de laboratorio, que consiste en una fuente de luz para iluminar la muestra y uno o más detectores fotoeléctricos con un dispositivo de lectura para indicar la intensidad de la luz dispersada a 90 ° hacia la trayectoria de la luz incidente. Se recomienda el uso de un instrumento diseñado para minimizar la pérdida de luz que llega al detector en ausencia de turbidez y que está libre de una desviación significativa después de un corto período de calentamiento. La sensibilidad del instrumento debe permitir detectar diferencias en la turbidez de 0.02 NTU o menos en el rango más bajo en aguas con una turbidez de menos de 1 NTU. Varios rangos pueden ser necesarios para obtener una cobertura adecuada y suficiente sensibilidad para baja turbidez. Las diferencias en el diseño del instrumento causarán diferencias en valores medidos de turbidez, aunque la misma suspensión se utiliza para la calibración. Para minimizar tales diferencias, observe los siguientes criterios de diseño:

- Fuente de luz: lámpara de filamento de tungsteno que funciona a una temperatura de color entre 2200 y 3000 ° K.
- Distancia recorrida por la luz incidente y la luz dispersada dentro del tubo de muestra: no debe superar los 10 cm.
- Aceptación del ángulo de luz por el detector: centrado a 90° con respecto a la trayectoria de la luz incidente y no debe exceder de $\pm 30^\circ$ desde dicho ángulo. El sistema de detección y filtro, si se usa, tendrá un pico espectral respuesta entre 400 y 600 nm.

Para el tratamiento de las muestras que componen este ensayo se utilizó el turbidímetro “HACH”, modelo “2100N”, con número de serie 08030C023486.

Celdas de muestra: use celdas de muestra o tubos de vidrio o plástico transparente e incoloro. Mantenga las celdas escrupulosamente limpias, tanto por dentro como por fuera, y deséchelas si están rayadas o grabadas. Nunca las toque donde el haz de luz del instrumento los golpee. Las celdas deben contar con suficiente longitud adicional, o con una funda protectora, para que puedan ser manejados adecuadamente. Llene celdas con muestras y estándares que se han agitado vigorosamente y deje transcurrir suficiente tiempo para que las burbujas de aire se escapen. Limpie las celdas de la muestra lavándolas a fondo con jabón de laboratorio por dentro y por fuera seguido de enjuagues múltiples con agua destilada o desionizada; deje que las células se sequen al aire. Maneje las celdas de muestra solo por la parte superior para evitar la suciedad y las huellas dactilares dentro de la trayectoria de la luz. Las células se pueden recubrir en el exterior con una capa delgada de aceite de silicona para enmascarar pequeñas imperfecciones y los arañazos que pueden contribuir a desviar la luz. Usar aceite de silicona con el mismo Índice de refracción del vidrio. Evite el exceso de aceite porque puede atraer la suciedad y contaminar el compartimiento para la celda del instrumento. Con un paño suave y sin pelusas, esparza el aceite uniformemente y limpie el exceso de La celda debe parecer casi seca con poco o ningún aceite visible.

Debido a que las pequeñas diferencias entre las células de la muestra tienen un impacto significativo en la medición, use celdas idénticamente tratadas o la misma celda para la estandarización y la medición de la muestra.

c. Reactivos

I. Agua de dilución: el agua de alta pureza causará un poco de dispersión de la luz, que es detectada por Los nefelómetros como turbidez. Para obtener agua de baja turbidez para diluciones, valor nominal 0.02 NTU, pasar el agua de laboratorio con grado de reactivo a través de un filtro con un tamaño de poro suficientemente pequeño para eliminar todas las partículas mayores de 0.1 μm ; el filtro de membrana habitual utilizado para exámenes bacteriológicos no es adecuado. Enjuague el matraz colector al menos dos veces con agua filtrada y deseche los siguientes 200 mL.

Algunas aguas desmineralizadas comerciales embotelladas tienen una baja turbidez. Estos pueden ser utilizados cuando la filtración no es práctica o no se puede filtrar en el laboratorio una buena calidad de agua. Compruebe la turbidez del agua embotellada para asegurarse de que esté por debajo del nivel que se puede alcanzar en el laboratorio.

II. Suspensión estándar de formazina:

- Solución I: disuelva 1,000 g de sulfato de hidrazina, $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$, en agua destilada y diluya hasta 100 mL en un matraz volumétrico.

PRECAUCIÓN: El sulfato de hidrazina es un carcinógeno; evite Inhalación, ingestión y contacto con la piel. Las suspensiones de formazina pueden contener sulfato de hidracina residual.

- Solución II: disuelva 10,00 g de hexametilentetramina, $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$, en agua destilada y diluya hasta 100 mL en un matraz volumétrico.

En un matraz, mezcle 5,0 mL de solución I y 5,0 mL de solución II. Dejar reposar durante 24 horas a 25 ± 3 ° C. Esto resulta en una suspensión de 4000 NTU. Transfiera la suspensión estándar a un vidrio ámbar u otro bloqueador de luz UV. Haga diluciones de esta suspensión estándar. La suspensión es estable por hasta 1 año cuando se almacena adecuadamente.

Suspensiones de turbidez diluidas: diluir la suspensión estándar primaria de 4000 NTU con agua de dilución de alta calidad. Prepare inmediatamente antes del uso y deséchelo después del uso.

III. Estándares secundarios: los estándares secundarios son estándares que el fabricante (o un fabricante independiente) ha certificado darán resultados de calibración de instrumentos equivalentes (dentro de ciertos límites) a los resultados obtenidos cuando el instrumento se calibra con el estándar primario, es decir, formazina preparada por el usuario. Varios estándares secundarios están disponibles incluyendo: suspensiones comerciales estándar de formazina de 4000 NTU; suspensiones comerciales de microesferas de copolímero de estireno-divinilbenceno y artículos suministrados por los fabricantes de instrumentos, tales como células de muestra selladas llenas de suspensión de látex o con partículas de óxido de metal en un gel polimérico. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos¹ designa formazina preparada por el usuario, suspensiones comerciales de formazina y suspensiones comerciales de estireno-divinilbenceno como "Estándares primarios" y se reserva el término "Estándar secundario" para los estándares sellados mencionado anteriormente.

Estándares secundarios hechos con suspensiones de microesferas de copolímero de estireno-divinilbenceno es típicamente tan estable como la formazina concentrada y es mucho más estable que la formazina diluida. Estas suspensiones pueden ser específicas del instrumento; por lo tanto, use solo suspensiones formuladas para el tipo de nefelómetro utilizado. Los estándares secundarios proporcionados por el fabricante de instrumentos (a veces llamado estándares "permanentes") puede ser necesario para estandarizar algunos instrumentos antes de cada lectura y en otros instrumentos solo como una calibración para determinar cuándo es necesaria la calibración con el estándar primario.

Todos los estándares, incluso los llamados estándares "permanentes", cambian con el tiempo. Éstos deben ser reemplazados se supera la vida útil de los mismos. El deterioro puede detectarse midiendo la turbidez de la norma después de calibrar el instrumento con una formazina o con una suspensión de microesferas nueva. Si hay alguna duda sobre la integridad o el valor de turbidez de cualquier estándar secundario, verifique la calibración del instrumento primero con otro estándar secundario y luego, si es necesario, con una solución estándar de

formazina preparado por el usuario. La mayoría de los estándares secundarios han sido cuidadosamente preparados por sus fabricantes y debe, si se usa adecuadamente, arrojar resultados consistentes con los de la solución de formazina.

Preparar solución estándar primario de formazina solo como último recurso. La aplicación adecuada de los estándares secundarios es específica para cada marca y modelo de nefelómetro. No todos los estándares secundarios tienen que ser descartados cuando la comparación con un estándar primario muestra que su valor de turbidez ha cambiado. En algunos casos, el estándar secundario debe simplemente volver a etiquetarse con el nuevo valor de turbidez. Siga siempre las instrucciones del fabricante.

d. Procedimiento

I. Técnicas generales de medición: las técnicas de medición adecuadas son importantes minimizando los efectos de las variables del instrumento, así como la luz dispersa y las burbujas de aire. Sin importar el instrumento utilizado, la medición será más precisa y repetible si está se presta especial atención a las técnicas de medición adecuadas.

Mida la turbidez inmediatamente para evitar cambios de temperatura y floculación de partículas y sedimentación características de la muestra. Si la floculación es aparente, rompa los agregados por agitación. Evite la dilución siempre que sea posible. Las partículas suspendidas en la muestra original pueden disolverse o cambiar las características cuando la temperatura cambia o cuando la muestra se diluye.

Elimine el aire u otros gases arrastrados en la muestra antes de la medición. Preferiblemente desgasifique incluso si no hay burbujas visibles. Desgasifique mediante la aplicación de un vacío parcial, agregando un surfactante de tipo no espumante, usando un baño de ultrasonidos, o aplicando calor. En algunos casos, dos o más de estos métodos se pueden combinar para una eliminación más efectiva de las burbujas. Por ejemplo, puede ser necesario para combinar la adición de un surfactante con el uso de un baño de ultrasonidos para algunas condiciones

complejas. Cualquiera de estas técnicas, si se aplica incorrectamente, puede alterar la turbidez de la muestra; utilizar con cuidado.

Si la desgasificación no se puede aplicar, la formación de burbujas se minimizará si las muestras se mantienen a la temperatura y presión del agua antes del muestreo. No elimine las burbujas de aire dejando reposar la muestra durante un período de tiempo porque las partículas en reposo que causan turbidez pueden asentarse y la temperatura de la muestra puede cambiar. Ambas condiciones alteran la turbidez de la muestra, lo que resulta en una medición no representativa.

Se puede producir condensación en la superficie exterior de una celda de muestra cuando se está extrayendo una muestra fría en un ambiente cálido y húmedo. Esto interfiere con la medición de la turbidez. Retirar toda la humedad del exterior de la celda de muestra antes de colocar la celda en el instrumento. Si la condensación se repite, deje que la muestra se caliente ligeramente dejándola reposar a temperatura ambiente o sumergiéndola parcialmente en un baño de agua tibia por un corto tiempo. Asegúrese de que las muestras vuelvan a estar bien mezcladas.

II. Calibración del nefelómetro: siga las instrucciones de funcionamiento del fabricante. Corra al menos un estándar para cada rango de utilización del instrumento. Asegúrese de que el nefelómetro da lecturas estables en todos los rangos de sensibilidad utilizados.

III. Medición de turbidez: Agite suavemente la muestra. Espere hasta que desaparezcan las burbujas de aire y vierta la muestra en la celda. Cuando sea posible, vierta una muestra bien mezclada en la celda y sumérjala en un baño de ultrasonidos durante 1 a 2 s o aplicar desgasificación al vacío, lo que provoca la liberación completa de burbujas. Lea la turbidez directamente desde la pantalla del instrumento.

IV. Calibración de monitores de turbidez continua: calibre monitores de turbidez continua para turbidez baja al determinar la turbidez del agua que fluye fuera de ellos, usando un nefelómetro modelo de laboratorio, o calibre los instrumentos de acuerdo con las especificaciones del fabricante con formazina estándar primario o estándar secundario apropiado.

e. Interpretación de los resultados

Informe las lecturas de turbidez como lo expresa la Tabla 5:

Rango de Turbidez (NTU)	Registre el valor más cercano de NTU
0–1.0	0.05
1–10	0.1
10–40	1
40–100	5
100–400	10
400–1000	50
>1000	100

Tabla 4: Informe de las lecturas de turbidez según los valores detectados

Al comparar las eficiencias de tratamiento de agua, no estime la turbidez más de cerca de lo especificado anteriormente. Las incertidumbres y las discrepancias en las mediciones de turbidez hacen que sea poco probable que los resultados se puedan duplicar con mayor precisión que la especificada ⁽⁶⁾.

Determinación del color por el Método de Comparación Visual (APHA 2120-B):

a. Principio: el color se determina por comparación visual de la muestra con soluciones coloreadas de concentraciones conocidas. La comparación también se puede hacer con discos de vidrio especiales correctamente calibrados. El método platino-cobalto para medir el color es considerado estándar, siendo la unidad de color la producida por 1 mg de platino / L en forma de ion cloroplatinato. La proporción de cobalto/platino se puede variar para que coincida con el tono en casos especiales; la proporción dada a continuación es generalmente satisfactoria para igualar el color de las aguas naturales.

Aplicación: el método de platino-cobalto es útil para medir el color del agua potable y de agua en la que el color se debe a materiales naturales. No es aplicable a la mayoría residuos industriales altamente coloreados.

Interferencia: incluso una ligera turbidez hace que el color aparente sea notablemente más alto que el verdadero color, por lo tanto, elimine la turbidez antes de aproximar el color verdadero por lectura diferencial con diferentes filtros de color o mediante medidas de dispersión diferencial. Ninguna técnica, sin embargo, ha alcanzado el estado de un método estándar. Eliminar la turbidez por centrifugación o por el procedimiento de filtración descrito en el Método C. Centrifugar durante 1 h a menos que se haya demostrado que la centrifugación bajo otras condiciones logra una satisfactoria eliminación de la turbidez.

El valor del color del agua es extremadamente dependiente del pH y aumenta invariablemente a medida que el pH del agua aumenta. Al informar un valor de color, especifique el pH al que se determina el color.

Para fines de investigación o cuando los valores de color deben compararse entre laboratorios, determine la respuesta de color de un agua dada en un amplio rango de valores de pH.

Método de campo: debido a que el método estándar de platino-cobalto no es conveniente para el uso en campo, compare el color del agua con el de los discos de vidrio que se encuentran al final de los tubos metálicos que contienen tubos comparadores de vidrio llenos de muestra y agua destilada incolora. Empareje el color de muestra con el color del tubo de agua clara más el vidrio coloreado calibrado observando hacia una superficie blanca. Calibre cada disco para que se correspondan con la escala de colores del platino-cobalto. Los discos de vidrio dan resultados consistentes con los obtenidos por el método platino-cobalto y su uso se reconoce como un procedimiento de campo estándar.

Métodos de laboratorio no estándar: usar discos de vidrio o líquidos que no sean agua como los estándares para el trabajo de laboratorio solo se permiten si se han calibrado individualmente contra los estándares platino-cobalto. Aguas de color altamente inusual, como las que pueden ocurrir por mezcla con ciertos desechos industriales, pueden tener matices tan alejados de los estándares de

platino-cobalto que la comparación por el método estándar se torna difícil o incluso imposible. Para tales aguas, utilice los métodos en la Sección 2120C y la Sección 2120D. Sin embargo, los resultados obtenidos no son directamente comparables a los obtenidos con los estándares de platino-cobalto.

b. Muestreo: recoja muestras representativas en material de vidrio limpio. La determinación del color debe ser realizada dentro de un período razonable porque los cambios biológicos o físicos que ocurren en el almacenamiento pueden afectarlo. Con aguas de colores naturales, estos cambios invariablemente conducen a resultados deficientes.

f. Aparatología:

- Tubos de Nessler, de a pares, con capacidad de 50 mL, altos.
- Medidor de pH, para determinar el pH de la muestra (consulte la Sección 4500-H).

d. Elaboración de estándares: si no se puede comprar un suministro confiable de cloroplatinato de potasio, utilice ácido cloroplatínico preparado a partir de platino metálico. No use ácido cloroplatínico comercial porque es muy higroscópico y puede variar en contenido de platino. El cloroplatinato de potasio no es higroscópico.

Disuelva 1.246 g de cloroplatinato de potasio, K_2PtCl_6 (equivalente a 500 mg de Pt metálico) y 1,00 g de cloruro cobaltoso cristalizado, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (equivalente a aproximadamente 250 mg de metal Co) en agua destilada con 100 mL de HCl concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua destilada.

Esta solución estándar tiene un color de 500 unidades. Si el cloroplatinato de potasio no está disponible, disuelva 500 mg de Pt metálico puro en agua regia con la ayuda de calor; elimine el HNO_3 por evaporación repetida añadiendo porciones frescas de HCl concentrado. Disuelva el producto, junto con 1,00 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ cristalizado, como se indicó anteriormente.

Prepare estándares con colores de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 y 70 diluyendo 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 y 7,0 mL de la solución estándar de color preparada con agua destilada hasta 50 mL en tubos Nessler. Proteja estos estándares contra la evaporación y contaminación cuando no los esté utilizando.

e. Procedimiento:

I. Estimación de la muestra intacta: observe el color de la muestra llenando un tubo Nessler hasta la marca de 50 mL con muestra y comparándola con estándares. Observe desde arriba hacia abajo los tubos sobre una superficie blanca o espejular colocada en un ángulo tal que la luz se refleja hacia arriba a través de las columnas de líquido. Si hay turbidez presente y no se ha eliminado, informe como "color aparente". Si el color supera las 70 unidades, diluya la muestra con porciones de agua destilada hasta que el color esté dentro del rango de los estándares.

II. Medir el pH de cada muestra.

f. Cálculos:

Calcula las unidades de color utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades de Color} = \frac{A \times 50}{B}$$

Dónde:

A = color estimado de una muestra diluida, y

B = mL muestra tomada para la dilución.

Informe los resultados de color en números enteros y registre según lo detallado en la Tabla 5:

Unidades de Color	Registre al valor más cercano
1–50	1
51–100	5
101–250	10
251–500	20

Tabla 5: Informe de las lecturas de color según los valores detectados

Informar además el pH de la muestra ⁽⁷⁾.

Determinación de Fitoplancton (APHA 10200 A-F):

El término "plancton" se refiere a aquellas formas acuáticas microscópicas que tienen poca o ninguna resistencia a las corrientes y al vivir libres flotando y suspendidas en aguas naturales. Plantas planctónicas, "fitoplancton" y los animales planctónicos, "zooplancton" son alcanzados por esta denominación.

El fitoplancton (algas microscópicas) se presenta como formas unicelulares, coloniales o filamentosas. Muchos son fotosintéticos y son rodeados por zooplancton y otros organismos acuáticos. El zooplancton en agua dulce comprende principalmente protozoos, rotíferos, cladóceros y copépodos; una mayor variedad de organismos se produce en aguas marinas.

El plancton, particularmente el fitoplancton, se ha utilizado durante mucho tiempo como indicadores de la calidad del agua. Algunas especies florecen en aguas altamente eutróficas, mientras que otras son muy sensibles a los residuos orgánicos y/o químicos. Algunas especies desarrollan brotes nocivos, a veces generando sabores y olores ofensivos, o condiciones anóxicas o tóxicas que causan muertes de animales o enfermedades humanas.

El ensamblaje de especies de fitoplancton y zooplancton también puede ser útil para evaluar la calidad del agua.

Debido a sus cortos ciclos de vida, el plancton responde rápidamente a los cambios ambientales, y, por lo tanto, es más probable que su cultivo in-vivo y la composición de las especies indiquen la calidad de la masa de agua en la que se encuentran. Influyen fuertemente ciertos aspectos no biológicos de la calidad del agua (como pH, color, sabor y olor) y, en un sentido muy práctico, forman parte de la calidad del agua. Ciertos taxones a menudo son útiles para determinar el origen o la historia reciente de una determinada masa de agua. Sin embargo, debido a su naturaleza transitoria y, a menudo, su distribución irregular, la utilidad del plancton como indicador de calidad del agua pueden ser limitada. La información sobre el plancton como indicadores se interpreta mejor en conjunción con datos biológicos y fisicoquímicos colectivamente concurrentes. Los organismos planctónicos predominan en los estanques, lagos y océanos. Potamoplancton se desarrolla en grandes ríos con aguas de lento movimiento que se aproximan a las condiciones lénticas. Ya que su origen puede ser incierto y la duración de su exposición a contaminantes desconocidos, el plancton generalmente es menos valiosos como indicadores de calidad del agua en ambientes lóticos que en lénticos.

Método:

a. Técnicas de concentración: Los organismos contenidos en las muestras de agua a veces deben estar concentrados en el laboratorio antes del análisis. Existen tres técnicas para concentrar el fitoplancton, a saber, la sedimentación, filtración por membrana y la centrifugación se describen a continuación.

I. Sedimentación: es el método preferido de concentración porque no es selectivo (a diferencia de la filtración) y no destructiva (a diferencia de la filtración o centrifugación), aunque muchos de los picoplancton, los nanoplancton más pequeño, son flagelados que nadan activamente (en muestras conservadas) y no pueden asentarse por completo. El volumen concentrado varía inversamente con la abundancia de organismos y está relacionada con la turbidez de la muestra. Puede ser tan pequeño como 1 mL para su uso con un microscopio invertido o tan grande como 1 L para la enumeración de fitoplancton general.

Permita 1 h de sedimentación por mm de profundidad de columna. Para una muestra tratada (10 mL de detergente líquido/L) permita aproximadamente 0,5 horas de sedimentación por mm de profundidad. La muestra se puede concentrar en una serie de trasvases cuantitativos del sedimento desde el contenedor inicial a los secuencialmente más pequeños.

Utilice cámaras de sedimentación cilíndricas con fondos de vidrio delgados y transparentes. Llene cámaras de sedimentación evitando la formación de vórtices, manténgalos libres de vibraciones y muévalos con cuidado para evitar la distribución no aleatoria de la materia sedimentada. Con cuidado, sifone o decante los sobrenadantes para obtener el volumen final deseado (5 mL para montajes de diatomeas). Almacene la muestra concentrada en un frasco cerrado y etiquetado.

II. Filtración de membrana: este método permite el uso de un gran aumento para enumerar plánctones pequeños, Incluidos flagelados y cianobacterias. Sin embargo, formas delicadas como los flagelados "desnudos" se dañan incluso por filtración suave. Cuando las poblaciones son densas y el contenido de detritos es alto, el filtro se obstruye rápidamente y el cieno puede aplastar a los organismos u oscurecerlos de la vista.

Vierta un volumen medido de muestra bien mezclada en un embudo equipado con un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm . Aplique un vacío de menos de 50 kPa al filtro hasta que aproximadamente 0,5 cm de la muestra permanezca en el filtro. Rompa el vacío, luego aplique bajo vacío (aproximadamente 12 kPa) para eliminar el agua restante pero no secar el filtro.

Para muestras con un bajo contenido de fitoplancton y limo, el método no requiere conteo de plancton individuales para reunir datos de enumeración y aumenta la probabilidad de observar formas menos abundantes. Las muestras también pueden concentrarse en un filtro, invertirse en un portaobjetos de microscopio, y congelado rápidamente, lo que permite la eliminación del filtro y la transferencia de plancton al portaobjetos.

III. Centrifugación: el plancton se puede concentrar por centrifugación discontinua o continua. Centrifugue lotes de muestras a 1000 g durante 20 minutos.

La centrífuga continua Foerst ya no se recomienda como dispositivo cuantitativo, pero puede ser deseable continuar su uso en programas existentes para asegurar la continuidad con los datos recogidos previamente. Aunque la centrifugación acelera la sedimentación, puede dañar los organismos frágiles.

b. Ensamblaje de los preparados:

I. Preparados semipermanentes de fitoplancton: agite el concentrado de la muestra sedimentada y retire una submuestra con una pipeta de precisión calibrada. Limpie la pipeta regularmente. Para preparados húmedos, transfiera 0,1 mL a un portaobjetos de vidrio, coloque un cubreobjetos sobre la muestra y fíjelo con un adhesivo como esmalte transparente para evitar la evaporación. Para preparados semipermanentes, agregue unas gotas de glicerina al portaobjetos. A medida que la muestra envejece, el agua se evapora, dejando a los organismos incrustados en la glicerina. Si el cubreobjetos está correctamente adherido, la diapositiva puede conservarse durante algunos años si se almacena en la oscuridad.

II. Monturas permanentes de fitoplancton

i. Soportes de filtro de membrana: coloque dos gotas de aceite de inmersión en un portaobjetos etiquetado. Inmediatamente después de filtrar, coloque el filtro sobre el aceite con un par de pinzas y agregue dos gotas de aceite en la parte superior del filtro. El aceite impregna el filtro y lo hace transparente. El tiempo de impregnación es de 24 a 48 horas. Este procedimiento se puede completar en 1 a 2 horas aplicando calor (70 ° C). Cuando haya terminado, coloque unas gotas adicionales de aceite y cubra con un cubreobjetos. El filtro montado ya está listo para el examen microscópico. Alternativamente, monte filtros de membrana en montaje medio. Sumerja los filtros en 1-propanol para desplazar el agua residual y transfiera a xilol por varios minutos para borrar los filtros. Coloque una sección de filtro o el filtro completo en un portaobjetos de microscopio con el medio de montaje, cubra con cubreobjetos y seque a baja temperatura.

ii. Preparados sedimentados: hay dos técnicas disponibles para hacer monturas en resina permanente de fitoplancton natural que se ha depositado por sedimentación en un portaobjetos de microscopio o cubreobjetos y deshidratada por sustitución de vapor de etanol.

iii. Soportes de diatomeas: las muestras concentradas para el análisis de diatomeas por sedimentación o centrifugación pueden contener materiales disueltos, como sales marinas, formalina y detergentes, que dejarán residuos interferentes. Lave bien con agua destilada antes de la preparación del portaobjetos. Transfiera varias gotas de lavado del concentrado por medio de una pipeta desechable de gran calibre o un gotero de gran calibre portaobjetos sobre una superficie lo suficientemente caliente como para aumentar la velocidad de evaporación, pero no lo suficiente como para causar ebullición (use una pipeta o gotero de gran diámetro para evitar una posible filtración selectiva, por lo tanto, la exclusión, de formas más grandes o las que forman colonias o cadenas). Si el material limpiado está muy concentrado, mejore la distribución de diatomeas agregando gotas a un portaobjetos ya inundada con agua destilada. Evapore a sequedad. Repita la adición y la evaporación hasta que una cantidad suficiente de muestra ha sido transferida al vidrio de cobertura, pero evite producir un residuo tan denso que los organismos no pueden ser reconocidos. En caso de duda sobre la densidad, examinar bajo microscopio un compuesto. Después de la evaporación, incinere el residuo en el vidrio de la cubierta en una placa caliente a 300 ° a 500 ° C; alternativamente, utilice un horno de mufla. Esto suele requerir de 20 a 45 minutos. Montar como se encuentra descrito a continuación.

Trate las muestras concentradas para el análisis de diatomeas por filtración de membrana como lo describen Patrick y Reimer. Mezcle volúmenes iguales de ácido nítrico concentrado (HNO_3) y muestra. Trabaje bajo una campana. Agregue unos pocos granos de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 5 para facilitar la digestión del filtro y materia orgánica celular. Añada más dicromato si cambia el color de la solución de amarillo a verde. Coloque la muestra en una placa caliente y hierva hasta aproximadamente un tercio del volumen original. Alternativamente, dejar reposar la muestra tratada durante la noche. Este proceso de limpieza destruye la materia orgánica y deja solo conchas de diatomeas (frústulas). Enfríe, lave con agua destilada, y monte como se describe anteriormente. Transfiera las frústulas limpias a un vaso de cobertura y seque como se describe encima.

Coloque una gota de medio de montaje en el centro de un portaobjetos etiquetado. Utilice portaobjetos de 25 por 75 mm con extremos esmerilados. El uso de un medio de montaje microscópico adecuado de alto índice de refracción asegura soportes permanentes de fácil manejo para examen bajo inmersión en aceite. Calentar el preparado hasta cerca de los 90° C durante 1 a 2 minutos antes de aplicar el cubreobjetos caliente con su residuo de muestra para acelerar la evaporación del solvente en el medio de montaje. Retire el preparado a una superficie fría y enfríelo durante 5 a 10 segundos, aplique una presión firme pero suave sobre el vidrio de la cubierta con un instrumento amplio y plano.

c. Técnicas de recuento de fitoplancton

Algunos fitopláctones son unicelulares, mientras que otros son multicelulares (coloniales). La variedad de las configuraciones plantea un problema en la enumeración. Por ejemplo, si una colonia de cuatro celdas se puede informar como una colonia o cuatro células individuales. En la Tabla 6 se enumeran sugerencias para informar los recuentos hallados:

Método de enumeración	Unidad de recuento	Unidad de reporte
Recuento total de células	Una célula	Células/mL
Recuento de unidades naturales (recuento en grupos)	Un organismo (cualquier organismo unicelular o colonia natural)	Unidades/mL
Recuento de áreas estándares	400 μm^2	Células/mL

Tabla 6: Metodología sugerida para el informe de los recuentos hallados

Hacer un recuento total de células es lento y tedioso, especialmente cuando las colonias consisten en miles de células individuales. La unidad natural o grupo es el sistema más fácil de usar; sin embargo, no es necesariamente precisa porque el manejo y la conservación de la muestra pueden desalojar las células de la colonia. El método de la unidad también puede no ser cuantitativamente exacto ni reflejar la abundancia de biomasa o biovolumen. Cualquiera que sea el método elegido, identifíquelo en los resultados de los informes.

d. Procedimientos de conteo:

Para enumerar el plancton, use una celda o cámara de conteo que limite el volumen y el área para chequear el cálculo de densidades de población.

Cuando cuente con una cuadrícula de Whipple, establezca una convención para contar los organismos que se encuentran en una línea de límite exterior. Por ejemplo, al contar un "campo" (todo el cuadrado de Whipple), designe los límites superior e izquierdo como lados "sin contar", y los límites inferior y derecho como los lados a contar. Por lo tanto, marque cada la célula o colonia que se encuentre tocando un lado de "contar" desde adentro o desde afuera, pero ignore cualquier toque de un lado "sin contar". Si existieran cantidades significativas de filamentosas u otras formas grandes cruzan dos o más límites de la cuadrícula, cuéntelas por separado con un aumento menor e incluya su número en el recuento total.

No cuente las células muertas o las frústulas de diatomeas rotas. Cuente por separado diatomeas vacías como "diatomeas muertas" para usarlas en la conversión de las especies de diatomeas cuentan proporcionalmente a un conteo por mililitro.

La magnificación es importante en la identificación y enumeración del fitoplancton. A pesar de que los aumentos de 100x a 200x son útiles para contar grandes organismos o colonias, a menudo se requieren magnificaciones mucho mayores. Es útil categorizar técnicas para el fitoplancton contando según las ampliaciones previstas. Para lograr la magnificación requerida se empleó un microscopio binocular "ZEISS", modelo "Primo Star", número de serie 3118001527.

i. Métodos de bajo aumento (hasta 200 x): la celda Sedgwick-Rafter (S-R) es un dispositivo comúnmente utilizado para el conteo de plancton porque es fácil de manipular y proporciona datos razonablemente reproducibles cuando se

utilizan con un microscopio calibrado equipado con un ocular de medición dispositivo como la rejilla de Whipple. La mayor desventaja asociada con la celda es que los objetivos que proporcionan alta magnificación no se pueden utilizar. Como resultado, la celda S-R no es apropiada para examinar nanoplancton. La celda S-R tiene aproximadamente 50 mm de largo por 20 mm de ancho por 1 mm de profundidad. El área total de la parte inferior es de aproximadamente 1000 mm² y el volumen total es de aproximadamente 1000 mm³ o 1 mL. Verifique cuidadosamente la longitud y profundidad exactas de la celda con un micrómetro y calibrado antes de su uso.

Llenado de la celda: antes de llenar la celda S-R con una muestra, coloque la tapa de vidrio en diagonal a través de la celda y transfiera la muestra con una pipeta de gran calibre. Coloque la tapa deslizante ayudando a prevenir la formación de burbujas de aire en las esquinas de las celdas. El deslizamiento de la cubierta a menudo se gira lentamente para cubrir la parte interior de la celda S-R durante el llenado. No llene en exceso porque esto produciría una profundidad superior a 1 mm y produciría un conteo no válido. No permita grandes espacios de aire causados por la evaporación que pueden desarrollarse en la cámara durante un examen prolongado. Para evitar la formación de espacios de aire, ocasionalmente coloque una pequeña gota de agua destilada en el borde de vidrio de protección.

Antes de contar, deje que la celda S-R repose al menos 15 minutos para asentar el plancton. Cuente el plancton en la parte inferior de la celda S-R. Algunos fitopláctones, en particular algas verde-azuladas o flagelados motiles en muestras no conservadas, pueden no asentarse sino subir a la parte inferior del cubreobjetos. Cuando esto ocurra, cuente estos organismos y sume el total de los contados en el fondo de la celda para derivar el número total de organismos. Contar algas en tiras o campos.

ii. Recuento de tiras: una "tira" de la longitud de la celda constituye un volumen de aproximadamente 50 mm de largo, 1 mm de profundidad y el ancho de la rejilla de Whipple total. El número de tiras a contar es función de la precisión deseada y el número de tiras a contar. Unidades (células, colonias o filamentos) por tira. Derive el número de plancton en la célula S-R de la siguiente fórmula:

$$No./mL = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{L \times D \times W \times S}$$

Dónde:

- C** = Número de organismos contados
- L** = Largo de cada tira (largo de la célula S-R), en mm
- D** = Profundidad de una tira (Profundidad de la célula S-R), en mm
- W** = Ancho de una tira (ancho de la imagen), en mm, y
- S** = Número de tiras contadas

Multiplique o divida el número de celdas por mililitro por un factor de corrección para ajustar la dilución o concentración de la muestra.

iii. Recuento de campos: en muestras que contienen muchos plánctones (10 o más planificadores por campo), haga conteos de campo en lugar de conteos de tiras. Contar el plancton en campos aleatorios, cada uno compuesto por una rejilla de Whipple. El número de campos contados dependerá de la densidad de plancton y la precisión estadística deseada. Calcula el número de plancton por mililitro como sigue:

$$No./mL = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{A \times D \times F}$$

Dónde:

- C** = Número de organismos contados
- A** = Área del campo (ancho de la imagen), en mm²
- D** = Profundidad de una tira (profundidad de la célula S-R), en mm
- F** = Número de campos contados

Multiplique o divida el número de celdas por mililitro por un factor de corrección para ajustar la dilución o concentración de la muestra ⁽⁹⁾.

Recuento de Bacterias heterótrofas por el método de recuento en placa vertida (APHA 9215-B):

El recuento de placas heterotróficas (HPC), anteriormente conocido como el recuento de placas estándar, es un procedimiento para estimar el número de bacterias heterótrofas vivas en el agua y medir las variaciones durante el tratamiento y distribución del agua o en piscinas. Las colonias pueden surgir de pares, cadenas, grupos o células individuales, todos los cuales están incluidos en el término "Unidades Formadoras de Colonias" (UFC). El conteo final también depende de la interacción entre las colonias en desarrollo; elija la combinación de procedimiento y medio que produce el mayor número de colonias dentro del tiempo de incubación designado. Para comparar datos, utilice el mismo procedimiento y medio.

Se describen tres métodos diferentes y cuatro medios diferentes.

a. Método de placa vertida: El método de placa de vertida es fácil de realizar y admite volúmenes de muestra o muestra diluida que oscilen entre 0,1 y 2,0 mL. Las colonias producidas son relativamente pequeñas y compactas, mostrando menos tendencia a invadir unas con otras que las producidas por el crecimiento superficial. Por otro lado, las colonias sumergidas suelen crecer más lentamente y son difíciles de transferir. Un baño de agua termostáticamente controlado es esencial para el templado del agar, pero, aun así, un choque térmico significativo a las bacterias de la exposición transitoria de la muestra a 45 a 46 ° C puede presentar agar. Este método fue el seleccionado para el tratamiento de todas las muestras, utilizando como reactivo el agar PCA, Britania®, Argentina.

b. Método de la placa de propagación o siembra en superficie: el método de la placa de propagación no causa ningún choque térmico y las colonias se encuentran en la superficie del agar, donde pueden distinguirse fácilmente de las partículas y burbujas. Las colonias se pueden transferir rápidamente, y la morfología de la colonia se puede discernir fácilmente y ser comparada con las descripciones publicadas. Sin embargo, este método está limitado por el pequeño

volumen de muestra o muestra diluida que puede ser absorbida por el agar: 0,1 a 0,5 mL, dependiendo del grado de secado de las placas preparadas. Para utilizar este procedimiento, mantenga un suministro de las placas de agar absorbente, previamente secadas adecuadas.

c. Método de filtro de membrana: el método de filtro de membrana permite realizar pruebas en grandes volúmenes de agua de baja turbidez y es el método de elección para aguas de recuento bajo (<1 a 10 UFC / mL). Este método no produce ningún choque térmico, pero agrega el costo del filtro de membrana. Las desventajas incluyen el área de visualización más pequeña, la necesidad de detectar colonias por luz reflejada sobre un fondo blanco si no se usan filtros de color o manchas de contraste, el daño posible a células por presiones de filtración excesivas y posibles variaciones en la calidad del filtro de membrana.

I. Muestras y preparación de muestras.

Contenedores: recolectar muestras para examen microbiológico en vidrio o plástico de borosilicato no reactivo botellas que se han limpiado y enjuagado cuidadosamente, se les da un enjuague final con agua desionizada o agua destilada y esterilizada. Para algunas aplicaciones las muestras pueden ser recolectadas en bolsas plásticas pre esterilizadas.

II. Decloración

Agregue un agente reductor a los contenedores destinados a la recolección de agua que tenga residuos de cloro u otro halógeno, a menos que contengan caldo para la siembra directa de la muestra. El tiosulfato sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) es un agente declorante satisfactorio que neutraliza cualquier halógeno residual y evita la continuación de la acción bactericida durante el tránsito de la muestra. El examen entonces indicará con mayor precisión el verdadero contenido microbiano del agua en el momento del muestreo.

Para el muestreo de efluentes de aguas residuales cloradas, agregue suficiente $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a un frasco de muestra estéril limpio para dar una concentración de 100 mg/L en la muestra. En una botella de 120 mL, 0,1 mL de una solución al

10% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ neutralizará una muestra que contenga aproximadamente 15 mg/L de cloro residual.

Para muestras de agua potable, la concentración de agente decolorante se puede reducir: 0.1 mL de una solución al 3% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en una botella de 120 mL neutralizará hasta 5 mg / L de cloro residual.

Bolsas de plástico o botellas que contienen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ están disponibles comercialmente.

III. Procedimientos de muestreo.

Cuando se recolecte la muestra, deje un amplio espacio de aire en la botella (al menos 2,5 cm) para facilitar la mezcla agitando, antes del examen. Recoger muestras que sean representativas del agua que se está analizando, enjuague o desinfecte los puertos de muestra, y use técnicas asépticas para evitar la contaminación de la muestra.

Mantenga el frasco de muestreo cerrado hasta el momento de su llenado. Retire el tapón y la tapa como una unidad; no contamine la superficie interna del tapón o tapa y el cuello de la botella. Llène el recipiente sin enjuagar, reemplace el tapón o la tapa de inmediato, y si se usa, asegure la tapa alrededor del cuello de la botella.

a. Agua potable: si la muestra de agua se toma de un grifo del sistema de distribución sin accesorios, seleccione un grifo que está suministrando agua desde una tubería de servicio directamente conectada con el sistema de distribución principal, y no se sirve, por ejemplo, desde una cisterna o tanque de almacenamiento. Abra el grifo completamente y deje que el agua corra durante 2 o 3 minutos, o durante un tiempo suficiente para permitir la limpieza de la línea de servicio. Reduzca el flujo de agua para permitir el llenado de la botella sin salpicaduras. Si la limpieza del grifo es cuestionable, elija otro grifo. Si se requiere un grifo cuestionable para fines de muestreo especiales, desinfecte el grifo (dentro y fuera) aplicando una solución de hipoclorito de sodio (100 mg NaOCl /L) a la llave antes del muestreo; deje correr el agua durante 2 a 3 minutos adicionales después del tratamiento. No tome muestras de grifos con fugas que permiten que el agua fluya por el exterior del grifo. En el muestreo de una canilla mezcladora retire los accesorios del grifo, como la pantalla o la protección contra salpicaduras, deje

correr el agua caliente durante 2 minutos, luego agua fría durante 2 a 3 minutos, y recolecte la muestra cómo se indica arriba.

Si la muestra se toma de un pozo con una bomba de mano, bombee agua para desechar alrededor de 5 a 10 minutos o hasta que la temperatura del agua se haya estabilizado antes de recoger la muestra. Si se debe utilizar un lugar de muestreo al aire libre, evite recoger muestras de hidrantes a prueba de heladas. Si no hay maquinaria de bombeo, recoja una muestra directamente del pozo mediante una botella esterilizado equipada con un peso en la base; tenga cuidado para evitar contaminar las muestras por cualquier escoria superficial. También se pueden usar otros dispositivos de muestreo estériles, como un fiador de viaje.

En la evaluación de agua potable, recolecte muestras de agua terminada de los sitios de distribución seleccionado para asegurar una cobertura sistemática durante cada mes. Elegir cuidadosamente los sitios de muestreo del sistema de distribución para incluir secciones sin salida para demostrar la calidad bacteriológica en toda la red y garantizar que la contaminación localizada no ocurra a través de conexiones cruzadas, roturas en las líneas de distribución, o reducción de presión positiva. Muestra

Las ubicaciones pueden ser sitios públicos (estaciones de policía y bomberos, edificios de oficinas gubernamentales, escuelas, autobuses y estaciones de tren, aeropuertos, parques comunitarios), establecimientos comerciales (restaurantes, estaciones de servicio, edificios de oficinas, plantas industriales, residencias privadas (residencias individuales, apartamentos edificios y complejos de casas adosadas), y estaciones de muestreo especiales integradas en la red de distribución. Preferiblemente evite los grifos al aire libre, las bocas de incendio, las unidades de tratamiento de agua y el reflujos.

Iniciar el análisis tan pronto como sea posible después de recolección para minimizar cambios en la población bacteriana. El tiempo entre la recolección y el análisis de las muestras es de 8 horas (tiempo de tránsito máximo de 6 horas, máximo, tiempo de procesamiento 2 horas). Cuando el análisis no puede comenzar dentro de 8 h, mantenga la muestra a una temperatura por debajo de 4°C, pero no congelar. El tiempo máximo transcurrido entre la recopilación y el análisis no debe superior a 24 horas. Las muestras utilizadas para este estudio fueron conservadas

según las condiciones anteriormente enunciadas en heladera expositora vertical "INELRO", modelo "MT470SC", número de serie 548007-Lote: 06808.

IV. Preparación de la muestra

Marque cada placa con el número de muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información necesaria antes del examen. Prepare al menos placas duplicadas para cada volumen de muestra o dilución examinado. Para los métodos de placa vertida o de siembra en superficie use vidrio estéril (65 cm²) o placas de Petri de plástico pre esterilizado desechables (57 cm²).

Mezcle a fondo todas las muestras o diluciones haciendo aproximadamente 25 movimientos completos de arriba abajo (o ida y vuelta). Opcionalmente, use un agitador mecánico para agitar las muestras o diluciones durante 15 segundos.

La necesidad de uniformidad dicta el uso de medios deshidratados. Nunca prepare los medios a partir ingredientes básicos cuando se dispone de medios deshidratados adecuados. Siga las instrucciones del fabricante para su rehidratación y esterilización. Los medios preparados comercialmente en forma líquida (estéril una ampolla u otra) también se puede usar si se sabe que da resultados equivalentes.

Selección de diluciones: seleccione la (s) dilución (es) para que el número total de colonias en una placa estará entre 30 y 300. Por ejemplo, cuando una placa heterotrófica como se sospecha una cuenta hasta 3000, preparar platos con dilución 10⁻².

Para la mayoría de las muestras de agua potable, las placas adecuadas para el recuento se obtendrán al platear 1 mL y 0,1 mL de muestra sin diluir y 1 mL de la dilución 10⁻².

Medición de porciones de muestra: utilice una pipeta estéril para las transferencias iniciales y posteriores de cada contenedor si la pipeta se contamina antes de que se completen las transferencias, reemplace con otra pipeta estéril. Use una pipeta estéril separada para las transferencias de cada dilución diferente. No prepare diluciones y verter platos en luz solar directa. Tenga cuidado al retirar las pipetas estériles del envase; para evitar la contaminación, no arrastre la punta

de la pipeta a través de los extremos expuestos de las pipetas en el envase o a través de los labios y cuellos de botellas de dilución. Al retirar la muestra, no inserte la pipeta más de 2,5 cm por debajo de la superficie de la muestra o dilución.

Medición de diluciones: Al descargar porciones de muestra, sostenga la pipeta en un ángulo de aproximadamente 45 ° con la punta tocando el fondo de la placa de Petri o el interior del cuello de la botella de dilución. Levante la tapa de la placa de Petri lo suficientemente alto como para insertar la pipeta. Deje 2 a 4 s para que el líquido se drene de la marca de graduación de 1 mL en la punta de la pipeta. Si la pipeta no es de tipo de soplado, toque la punta de la pipeta una vez contra un lugar seco en el fondo de placa de Petri. Menos preferiblemente, use una pipeta de soplado tapada con algodón y sople suavemente el volumen restante de dilución de la muestra.

Cuando se miden cantidades de 0,1 mL, dejar la muestra diluida drene de la graduación de referencia elegida hasta que se hayan entregado 0.1 mL. Quitar la pipeta sin retocar nuevamente la placa.

Pipetear 1 mL, 0,1 mL u otro volumen adecuado en una placa de Petri estéril antes de añadir medio de cultivo fundido. Utilice diluciones decimales en la preparación de volúmenes de muestra de menos de 0,1 mL; al examinar las aguas residuales o el agua turbia, no mida un inóculo de 0,1 mL de la muestra original, pero prepara una dilución adecuada. Prepare al menos dos placas replicadas para cada muestra dilución utilizada. Después de depositar las porciones de prueba para cada serie de placas, verter el medio de cultivo y mezclar con cuidado. No deje que transcurran más de 20 minutos entre el inicio del pipeteo y el vertido de las placas.

V. Plaqueo

Fusión del medio: fundir el medio de agar sólido estéril en agua hirviendo o por exposición a vapor que fluye en un recipiente parcialmente cerrado, pero evite la exposición prolongada a niveles de temperaturas innecesariamente durante y después del derretimiento. No vuelva a esterilizar el medio. Si se funden en dos o más lotes de medio, use todos los lotes en orden de fusión, siempre que los contenidos quedan completamente fundidos. Deseche el agar derretido que contiene precipitado. Mantenga el medio fundido en un baño de agua entre 44 y 46 ° C hasta su uso, preferiblemente no más de 3 h. En un recipiente separado,

coloque un termómetro en agua o medio que haya sido expuesto al mismo calentamiento y enfriamiento que el medio de recubrimiento. No dependa del sentido del tacto para indicar la temperatura media adecuada al verter agar. Antes de usar un nuevo lote de medio prueba su idoneidad.

Placas de vertido: limite el número de muestras que se deben colocar en una serie para que no transcurran más de 20 minutos (preferiblemente 10 minutos) entre la dilución de la primera muestra y el vertido de la última placa de la serie. Verter al menos 10 a 12 mL de medio licuado mantenido a 44 a 46° C en cada placa levantando suavemente la cubierta lo suficientemente alto como para verter. Con cuidado, evite derramar medio fuera del recipiente o en el interior de la tapa del plato al verter. Cuando se vierte agar de matraces o tubos que se han mantenido en un baño de agua, limpie con una toalla de papel limpia y flamee el cuello antes de cubrirlo. A medida que se vierte cada placa, mezcle bien el medio fundido con las porciones de prueba en una placa de Petri, teniendo cuidado de no salpicar la mezcla sobre el borde, girando el plato primero en una dirección y luego en la dirección opuesta, o girando e inclinando. Deje que las placas se solidifiquen (dentro de 10 minutos) en una superficie nivelada. Después de que el medio se solidifique, invierta las placas y coloque en la incubadora.

Controles de esterilidad: verifique la esterilidad de los blancos de agua de dilución y media mediante el control de vertido placas para cada serie de muestras. Prepare controles adicionales para determinar la contaminación de placas, pipetas, y aire de la sala.

VI. Incubación:

Para propósitos de monitoreo de cumplimiento bajo la Regla de Tratamiento de Agua de Superficie de EE. UU. EPA (40 CFR 141.74), disposición sobre bacterias heterótrofas, incubar placas de vertido a 35 ° C durante 48 h. Para la incubación de las muestras analizadas se utilizó una estufa de cultivo "SAN JOR", modelo "SL70CDB", número de serie 29851.

De lo contrario, seleccione entre los tiempos y temperaturas recomendados para monitorear los cambios en calidad del agua. Los recuentos más altos

normalmente se obtendrán de 5 a 7 días de incubación a una temperatura de 20 a 28 ° C.

Durante la incubación, mantenga la humedad dentro de la incubadora para que las placas no tengan pérdida de peso por humedad superior al 15%. Esto es especialmente importante si la incubación prolongada es usada. Una bandeja de agua colocada en el fondo de la incubadora puede ser suficiente, pero tenga en cuenta que, para evitar la oxidación, las paredes interiores y las estanterías deben ser de acero inoxidable de alto grado o aluminio anodizado. Para incubación prolongada en incubadoras no humidificadas, sellar placas en envase de plástico.

VII. Conteo:

Cuente todas las colonias en las placas seleccionadas inmediatamente después de la incubación. Si el conteo debe retrasarse temporalmente, almacene las placas a una temperatura de 5 a 10 ° C durante no más de 24 h, pero evite esto como práctica de rutina. Registre los resultados de los controles de esterilidad en el informe para cada lote de muestras.

Use una ayuda de un equipo de conteo aprobado, como el contador de colonias de Quebec, para el conteo manual. Si dicho equipo no está disponible, cuente con cualquier otro contador siempre que proporcione ampliación e iluminación. Los instrumentos automáticos de conteo de placas están disponibles. Estos en general, utilizan un escáner de televisión acoplado a una lente de aumento y un paquete electrónico.

Su uso es aceptable si la evaluación en paralelo con el conteo manual da resultados comparables.

Considere solo placas que tengan de 30 a 300 colonias para determinar el recuento de la placa. Calcule el recuento de bacterias por mililitro mediante la siguiente ecuación:

$$UFC/mL = \frac{\text{colonias contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen inoculado, en mL}}$$

Si no hay placas con 30 a 300 colonias, y una o más placas tienen más de 300 colonias, use la (s) placa (s) que tengan un recuento cercano a las 300 colonias. Calcule la cuenta como se especifica arriba, e informe como UFC estimado por mililitro.

Si las placas de todas las diluciones de cualquier muestra no tienen colonias, informe el recuento como menos de una (<1) dividido por el volumen de muestra más grande correspondiente utilizado. Por ejemplo, si no hay colonias a partir del volumen de muestra de 0,01 mL, informe el recuento como menos de 100 (<100) estimado UFC/mL.

Si el número de colonias por placa supera con creces las 300, no informe el resultado como "demasiado numeroso para cuenta" (TNTC). Si hay menos de 10 colonias / cm², cuente las colonias en 13 cuadrados (presentes en la plantilla del contador de colonias) que tiene distribución de colonias representativa. Si es posible, seleccione siete cuadrados consecutivos horizontalmente a través de la placa y seis cuadrados consecutivos verticalmente, teniendo cuidado de no contar un cuadrado más de una vez. Sume y multiplique el número de colonias representativas en 13 centímetros cuadrados por 5 para calcular las colonias estimadas por placa cuando el área de la placa es de 65 cm².

Cuando haya más de 10 colonias por cm², cuente cuatro cuadrados representativos, tome el conteo promedio por centímetro cuadrado, y multiplique por el factor apropiado para estimar las colonias por placa.

El factor es 57 para las placas de plástico desechables y 65 para las placas de vidrio. Cuando en las placas se cuentan bacterias apiñadas son mayores que 100 colonias / cm², informe el resultado como mayor que (>) 6500 dividido por el volumen de muestra más pequeño chapado para placas de vidrio o mayor que (>) 5700 dividido por el volumen de muestra más pequeño plateado para placas de plástico. Informe como unidades estimadas de formación de colonias por mililitro.

Si se encuentran colonias dispersas (esparcidores) en las placas seleccionadas, cuente las colonias en porciones representativas solo cuando las colonias están bien distribuidas en áreas sin esparcidores y el área cubierta por el (los) esparcidor (es) no excede la mitad del área de la placa.

VIII. Registro e informe de los resultados

El término "unidades formadoras de colonias" (UFC) es descriptivo de los métodos utilizados; por lo tanto, reporte todos los conteos como unidades formadoras de colonias. Incluya en el informe el método utilizado, y la temperatura, tiempo, y el medio de incubación. Por ejemplo:

*UFC / mL, método de placa de vertido, 35 ° C / 48 h,
incubación en PCA*

Para calcular el recuento de placas heterótrofas, UFC / mL, divida el número total de colonias o número promedio (si hay placas duplicadas de la misma dilución) por placa por volumen de muestra. Grabar Los volúmenes de muestra utilizados y el número de colonias en cada placa contaron o estimaron.

Cuando las colonias en placas duplicadas y / o diluciones consecutivas se cuentan y los resultados son promediado antes de ser registrado, redondee los conteos a dos cifras significativas solo cuando se convierta a unidades formadoras de colonias.

Evite crear precisión ficticia al calcular unidades formadoras de colonias grabando solo los dos primeros dígitos de la izquierda. Sube el segundo dígito al siguiente número más alto cuando el tercer dígito de la izquierda es 5, 6, 7, 8 o 9; Usa ceros para cada dígito sucesivo hacia el segundo dígito. Por ejemplo, informe un conteo de 142 como 140 y un conteo de 155 como 160, pero reporte un conteo de 35 como 35 ⁽²⁰⁾.

Detección y enumeración de *E. coli* y bacterias coliformes totales mediante el método de filtración de membrana (ISO 9308:2000-1):

Los coliformes totales son las *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas y constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un período de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C.

Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo coliforme forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc.

Una elevada proporción de los coliformes que existen en los sistemas de distribución no se debe a un fallo en el tratamiento en la planta, sino a un recrecimiento de las bacterias en las conducciones. Dado que es difícil distinguir entre recrecimiento de coliformes y nuevas contaminaciones, se admite que todas las apariciones de coliformes son nuevas contaminaciones, mientras no se demuestre lo contrario.

Dentro del grupo de los coliformes totales existe un subgrupo que es el de los Coliformes fecales. Los coliformes fecales son coliformes totales que además fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a temperaturas comprendidas entre 44 y 45°C en presencia de sales biliares. Los coliformes fecales comprenden principalmente *Escherichia coli* y algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Su origen es principalmente fecal y por esos se consideran índices de contaminación fecal. Pero el verdadero índice de contaminación fecal es *Escherichia coli* tipo I ya que su origen fecal es seguro. Desde el punto de vista metodológico *E. coli* es el Coliforme as es positivo a la prueba del Indol ⁽²¹⁾.

E. coli pertenece al grupo de los coliformes fecales termotolerantes. Es el anaerobio facultativo predominante en el intestino, y parte de la microflora que mantiene la fisiología en el hospedador sano altamente específico de heces humanas y de animales de sangre caliente ⁽²²⁾.

La mayoría de las bacterias *E. coli* no causan enfermedad, pero si una persona se enferma de esta bacteria, el sitio primario de infección es el tracto gastrointestinal y los síntomas pueden incluir náuseas, vómitos, diarrea y fiebre. Esta bacteria vive y crece de forma natural en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y los animales, pero si entra en el lugar equivocado en el cuerpo, por ejemplo, los riñones o la sangre, puede causar enfermedad. Según Ingerson y Reid (2011), la infección puede diseminarse en el cuerpo (a la sangre, el hígado y el sistema nervioso). Estos microorganismos se eliminan en el material fecal, o las heces, y la ruta de transmisión es “fecal-oral”.

Los alimentos y agua contaminada son las formas más comunes de ser expuestos a *E. coli*. Hay cepas específicas bacterianas que pueden causar enfermedades y también hay tipos que no causan ninguna enfermedad.

Algunos de los tipos dañinos de *E. coli* se clasifican en los siguientes grupos: Enterotoxigénico (ETEC), Enteropatógenos (EPEC), Enterohemorrágico (EHEC) y Enteroinvasivo (EIEC). ETEC, EPEC y EIEC son transmitidos generalmente a través de alimentos y agua contaminada. Un tipo mejor conocido de *E. coli* es O157:H7 que se encuentra bajo el grupo EHEC y es comúnmente la causa de alimentos contaminados tales como espinacas y carne, pero también se ha implicado en epidemias donde el agua era la fuente de la contaminación.

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** estas bacterias colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas AFC (Antígeno Factor de colonización) o por su sigla derivada del inglés CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST).

Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la

diarrea del viajero. La enfermedad tiene un período de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave.

La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10⁸ UFC (unidades formadoras de colonias).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** se las suele relacionar con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida.¹¹ La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7, responsable del síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC). Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó "shiga-like toxin" o toxina semejante a shiga (SLT) o "shiga toxin" (STX), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de STEC.

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. La STX actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes STX₁ y STX₂ que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gene cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodáltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gene *eae* también se encuentra en las cepas *E. coli* enteropatogénica (EPEC). Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadáltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina.

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad:

a) cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E

b) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa.

La otra clasificación es en función del serotipo:

a) cepas *E. coli* O157:H7. Este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y CH. *E. coli* O157:H7 se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio es el intestino de ganado bovino. También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos, alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados, aun cuando estos alimentos tengan un pH de 3,4 condición en la que puede sobrevivir varios días. La transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua contaminada; también puede ser de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos. Hay estudios que sugieren la importancia de la mosca doméstica como vector en la transmisión de *E. coli* O157:H7

b) b) cepas no-O157:H7 cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7. Estas cepas pueden ser sorbitol positivo, y sus serotipos son diferentes del O157:H7. Actualmente hay más de 200 serotipos. El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7 y también de carne de pavo, ternera, pescado y mariscos.

El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas EHEC no-O157:H7 es la toxina STX; también tienen el fenómeno de A/E y la presencia de pO157.

El período de incubación de EHEC es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas. Se cura o bien llega hasta SUH.

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC):** tanto este grupo, como *Shigella spp* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado plnv, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis.

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

***E. coli* enteropatógena (EPEC):** fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E).^{2,33} La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales. En la adherencia es necesaria la síntesis

de una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gene cromosomal eae y que sirve como señal en A/E.

En ensayos in vitro las cepas EPEC se caracterizan por formar microcolonias en el citoplasma de las células Hep-2 y su estudio incluye factores de patogenicidad como el efecto A/E, presencia de plásmidos y fimbrias.

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes eae para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes eae, pero no el plásmido EAF.

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas.

El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción.

El diagnóstico de EPEC incluye ensayos in vitro en cultivos celulares y métodos moleculares.

E. coli enteroagregativa (EAEC): Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC, pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que además eran negativas a la prueba de EAF. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2.

La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gene aggA que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente

diferente a AAF/I y que está codificada por el gene *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias.

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. En el plásmido de 60 MDa de EAEC también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI.

El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un período de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito y sin o con poca fiebre. La prueba de referencia para el diagnóstico de EAEC es la observación de la adherencia agregativa en células Hep-2 de cultivos bacterianos, previamente inoculados en medio Luria e incubados en condiciones estacionarias y a 37 °C⁽³¹⁾.

***E. coli* de adherencia difusa (DAEC):** las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. Al realizar ensayos in vitro en células CaCo y Hep-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado in vivo.

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. En el cuadro III se indican los métodos de diagnóstico. La hibridación con sondas derivadas de un fragmento del gene *daaC*, que codifica para la fimbria F-1845, también se ha empleado para el diagnóstico, pero puede presentar falsos positivos, y el diagnóstico empleando PCR aún no se ha desarrollado ⁽³²⁾.

La presencia de *E. coli* en el agua es una fuerte indicación de una reciente contaminación de aguas residuales o contaminación de residuos de animales. Es importante tener en cuenta que, tanto esta bacteria como los residuos de animales/humanos pueden entrar en nuestra agua de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, durante la lluvia y derretimiento de la nieve, *E. coli* puede pasar de la superficie de la tierra hacia los ríos, arroyos, lagos o aguas subterráneas. Otras formas son la fauna silvestre, fosas sépticas defectuosas, actividades recreativas y prácticas locales de uso del suelo (por ejemplo, estiércol utilizado como fertilizante y ganado).

Las fuentes de contaminación fecales de humanos y animales representan un grave riesgo para la salud debido a la alta probabilidad de la existencia de agentes patógenos en los residuos fecales. El ganado vacuno, cerdos y gallinas también acarrean patógenos que pueden causar enfermedades y pueden transmitirse de animales a humanos. Por lo tanto, la introducción de heces de animales o humanos en el agua es de mucha preocupación.

Numerosos estudios se han realizado en todo el mundo para evaluar la relación entre la calidad del agua utilizada para actividades recreacionales; y los efectos adversos en la salud de las personas que tienen contacto con el agua a través de actividades recreativas como la natación y la pesca, entre otras.

Además, la presencia de *E. coli* puede ser indicativo de la contaminación con otras bacterias, virus o protozoos que pueden causar enfermedades, como *Salmonella*, *Cryptosporidium*, entre otros.

Ya que el agua contaminada posa una gran amenaza para la salud humana, los administradores del agua y las agencias reguladoras han diseñado pruebas para informar al público si nuestra agua es segura. Comúnmente utilizamos *E. coli*

para indicar que la contaminación fecal se encuentra presente en el agua. A pesar de que no queremos encontrar a este agente bacteriano en el agua, estos pueden ser fácilmente probados y cuantificados por métodos simples. Por lo tanto, su detección en el agua significa que contaminación fecal ha ocurrido y sugiere que los patógenos entéricos, como los mencionados anteriormente, pueden estar presentes. Esto también significa que los humanos y los animales no deben entrar en contacto con el agua contaminada hasta que la presencia de *E. coli* ya no sea detectada, y el agua se considera segura ⁽³³⁾.

Técnica para su investigación por el método de filtración por membrana:

I. Filtración: se filtra la muestra (o volúmenes mayores) utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm con unidades de filtración estériles como mínima precaución para evitar la contaminación accidental. Considerar que se interrumpa una serie de filtraciones cuando transcurre un intervalo de 30 o más minutos entre la filtración de 2 muestras. Si se produjera una interrupción de este tipo, tratar la filtración siguiente como si fuera una nueva serie y esterilizar los soportes de los filtros de membrana que se estén utilizando. Para la filtración de estas muestras se empleó un manifold de 3 estaciones de acero inoxidable "HA", y 3 embudos de filtración con contenedor "NALGENE", modelo "300-410". Para la generación de vacío se utilizó una bomba de vacío "Vane Vacuum Pump", modelo "2XZ-1G".

El tamaño de la muestra analizada dependerá de la densidad bacteriana que se espere, que en las muestras de agua potable solo estará limitada por el grado de turbidez o por el crecimiento de no coliformes en el medio. Un volumen ideal de muestra es el que proporciona alrededor de 50 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos. El agua potable se analiza filtrando entre 100 y 500 mL, aunque se puede filtrar más, o bien muestras duplicadas de volúmenes más pequeños, por ejemplo: analizar 2 muestras de 50 mL respectivamente, o 4 de 25 mL respectivamente.

Cuando se requiera filtrar menos de 10 mL de muestra diluidos o no , preparar la muestra en un frasco estéril con entre 25 y 50 mL de agua peptonada al 0,1%. De esta manera se aumenta el volumen del agua, lo que ayuda a obtener

una dispersión uniforme de la suspensión bacteriana en la totalidad de la superficie filtrante efectiva.

Observaciones generales: las pinzas deben permanecer en un recipiente con solución de alcohol de 70° vol. y ser flameadas antes de su utilización. Al finalizar la filtración de cada muestra, se lavará el equipo de filtración utilizando una pisseta estéril con solución de fosfato estéril (agua de lavado), realizando movimientos circulares de la copa hacia el soporte y sobre las paredes del mismo. Esto debe realizarse como mínimo 3 veces y con la bomba de vacío encendida, para evitar reflujo del líquido.

La unidad de filtración debe lavarse al final de cada serie utilizando solución de hipoclorito de sodio 0,5% (agua lavandina) y enjuagándolo con agua destilada. Luego debe autoclavarse a 121°C durante 15 minutos.

II. Incubación, diferenciación y recuento: después de efectuar la filtración de la muestra, se coloca la membrana sobre la placa, con medio M-Endo o Agar Endo-LES, asegurando que no quede aire atrapado entre la membrana y el medio, y se incuba a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 2 horas con la tapa hacia arriba. Para el tratamiento de estas muestras el reactivo utilizado como medio de incubación fue el agar M-Endo Acumedia®, Estados Unidos de Norteamérica. Las muestras que formaron parte de este estudio se incubaron como se indica previamente en este párrafo en una estufa marca "FAL", modelo "343", número de serie 1289.

Paralelamente, se debe realizar el control positivo con una cepa target, estriando sobre la superficie de una placa con agar ENDO e incubando la misma en las mismas condiciones de la/las muestra problema.

Posterior a la incubación, examinar los filtros de membrana y contar las colonias que se presenten, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

- Contar como presuntivas de *Escherichia coli*, a las colonias moradas oscuro con brillo metálico

Para la confirmación de las colonias presuntivas es necesario transferir al menos 5 de ellas a agar TSA e incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas. Posterior a ello, realizar la prueba del indol.

- Contar como presuntos coliformes, a las colonias moradas sin brillo metálico.

III. Confirmación: ensayar la confirmación preferiblemente sobre todas, o al menos 5 colonias. Aislar en TSA e incubar a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Pasado este tiempo, se realiza la prueba de la oxidasa. El pasaje a TSA solo podrá hacerse cuando la colonia se encuentre totalmente aislada de otras que pudieran producir un falso positivo. Las colonias a confirmar se incubaron como se indica previamente en este párrafo en agar TSA, Biokar®, Francia; y se llevaron por el período arriba detallado a una estufa "FAL", modelo "343", número de serie 1289.

Observaciones generales: cuando la muestra posea alta cantidad de flora acompañante o "background", se deberá pasar 5 colonias aisladas a un agar Mac Conkey, Britania®, Argentina. Incubar a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Finalizado el tiempo, observar colonias rosadas rojizas con un halo de precipitación biliar y tomar una ansada y estriar en TSA. Proceder a la prueba de oxidasa normalmente.

a. Para la prueba de oxidasa en discos: la verificación rápida de las colonias se basa en la reacción de citocromo-oxidasa (CO). Ensayar la muestra con el control positivo (cepa coliforme) y control negativo (cepa no coliforme).

- i. En un portaobjetos nuevo colocar 4 gotas de solución fisiológica estéril
- ii. Tomar un disco de oxidasa con una pinza y apoyar sobre las gotas de solución fisiológica
- iii. Con una varilla de vidrio embebida en alcohol al 70% y flameada, tomar una colonia aislada y apoyar sobre el disco

El cambio instantáneo de color de incoloro a fucsia significara que la reacción es positiva.

Advertencia: no deberá considerarse un color aparecido luego de 30 segundos post inoculación. De forma paralela se procesarán las cepas control.

b. Para la prueba de oxidasa en tiras: la verificación rápida de las colonias se basa en la reacción de citocromo-oxidasa (CO). Ensayar la muestra con el control positivo (cepa coliforme) y control negativo (cepa no coliforme). En condiciones de esterilidad, tomar una tira comercial impregnada con el reactivo oxidasa y apoyarla sobre la colonia en estudio.

Realizar la lectura entre los 20 y 60 segundos posteriores. La aparición de un color magenta o gris oscuro, indica una reacción positiva. Mientras que el color amarillo indica una reacción negativa.

Se empleó esta técnica para la confirmación de presuntas colonias de Coliformes Totales, empleando las tiras reactivas Bactident® Oxidasa, Merck®, Alemania.

Advertencia: no deberá considerarse un color aparecido luego de 60 segundos post inoculación. De forma paralela se procesarán las cepas control.

c. Para la prueba de indol: se incuba el tubo con el caldo triptófano a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas y se detecta la producción de Indol por el agregado de 0,2 a 0,3 mL de reactivo de Kovacs. El desarrollo de un color rojo sobre la superficie del caldo confirma la producción de indol. Ensayar la muestra con la cepa de *Escherichia coli*. Para la incubación de las colonias presuntas de *E. coli* se utilizó un baño de incubación termostatzado "MARNE", modelo "BT 60", número de serie 1447.

Los reactivos utilizados para esta prueba confirmatoria corresponden a caldo triptona, formulado a partir de tripteína bacteriológica marca Britania®, Argentina y agua destilada; el reactivo de Kovacs, Merck®, Alemania.

Las colonias que den la prueba de oxidasa negativo se cuentan como Bacterias Coliformes. Las colonias que den la prueba de indol positivo se cuentan como *E. coli*.

d. Cálculo de la densidad de Coliformes: se informan las membranas que posean recuentos menores a 100 UFC/100 mL. En el caso de recuentos mayores

100 UFC/100 mL por placa y posterior a su confirmación, informar el resultado cómo > 100 UFC/100 mL.

A partir del recuento de colonias típicas de la membrana y teniendo en cuenta los resultados de los ensayos confirmatorios llevados a cabo, se calcula el número de bacterias coliformes y de *E. coli* presentes en 100 mL de la muestra de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\text{Número total de coliformes en 100 mL} = \frac{\text{colonias de coliformes} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

Para la verificación de recuentos de las colonias de coliformes, se ajusta el recuento inicial aplicando la siguiente forma:

$$\begin{array}{l} \text{colonias} \\ \text{de} \\ \text{coliformes} \\ \text{verificados} \end{array} = \frac{\text{número de colonias}}{\text{número de coliformes sujetas a verificación}} \times 100$$

(24)

P. aeruginosa: Determinación de *Pseudomonas aeruginosa*, según la técnica de filtración por membranas (APHA 9213 E):

a. **Descripción general:** *Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo gramnegativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina.

P. aeruginosa, al igual que otras pseudomonas fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono.

b. **Efectos sobre la salud humana:** puede causar diversos tipos de infecciones, pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *P. aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos como las piscinas y bañeras de hidromasaje. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.

c. **Fuentes y prevalencia:** esta bacteria es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua. *P. aeruginosa* es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. Se han aislado en gran variedad de ambientes húmedos, como fregaderos, baños de agua, sistemas de distribución de agua caliente, duchas y bañeras de hidromasaje.

d. **Vías de exposición:** la vía de infección principal es la exposición de tejidos vulnerables, en particular heridas y mucosas, a agua contaminada, así como la contaminación de instrumentos quirúrgicos. La limpieza de lentes de contacto con agua contaminada puede causar un tipo de queratitis. La ingestión de agua de consumo no es una fuente de infección importante.

e. **Relevancia de su presencia en el agua de consumo:** aunque la presencia de *P. aeruginosa* puede ser significativa en algunos entornos como en centros sanitarios, no hay evidencia de que los usos normales del agua de consumo sean una fuente de infección para la población general. No obstante, puede asociarse la presencia concentraciones altas de *P. aeruginosa* en el agua potable,

especialmente en el agua envasada, con quejas sobre su sabor, olor y turbidez. *P. aeruginosa* es sensible a la desinfección, por lo que una desinfección adecuada puede minimizar su entrada en los sistemas de distribución. Las medidas de control diseñadas para limitar la formación de biopelículas, como el tratamiento para optimizar la eliminación del carbono orgánico, la restricción del tiempo de residencia del agua en los sistemas de distribución y el mantenimiento de concentraciones residuales de desinfectantes, deberían reducir la proliferación de estos microorganismos. El recuento de Bacterias Heterótrofas detecta la presencia *P. aeruginosa* y puede utilizarse, junto con parámetros como las concentraciones residuales de desinfectantes, como indicador de condiciones que podrían sustentar la proliferación de estos microorganismos. Sin embargo, como *P. aeruginosa* es un microorganismo común en el medio ambiente, el análisis de *E. coli* (o bien de Coliformes Termotolerantes) no puede utilizarse con este propósito ⁽³³⁾.

f. Procedimiento para su detección:

I. Pruebas presuntivas: filtre 200 mL o menos de aguas naturales o hasta 500 mL aguas de piscina de natación a través de filtros de membrana estériles. Coloque cada membrana en un plato vertido de Agar M-PA modificado para que no haya espacio de aire entre la membrana y la superficie del agar. Se utilizó para la filtración de todas las muestras que comprendieron este ensayo un equipo de filtración compuesto por un manifold de 3 estaciones de acero inoxidable "HA", y 3 embudos de filtración con contenedor "NALGENE", modelo "300-410". El vacío requerido fue generado por una bomba de vacío "Vane Vacuum Pump", modelo "2XZ-1G".

Invertir las placas e incubar a $41,5 \pm 0,5$ ° C durante 72 horas. Típicamente, las colonias de *P. aeruginosa* son de 0,8 a 2,2 mm de diámetro y de apariencia plana con bordes exteriores claros y centros de color marrón a verdoso-negro. Contar colonias típicas, preferentemente de filtros que contienen de 20 a 80 colonias. Use una lupa de 10x a 15x como ayuda en el recuento de colonias. Las muestras fueron incubadas en una estufa de cultivo "SAN JOR", modelo "SL30C", número de serie 27966.

II. Pruebas de confirmación: use agar de leche para confirmar una serie de colonias típicas y atípicas. Haga una estría recta única (de 2 a 4 cm de largo)

estría de una colonia aislada en una placa de agar de leche e incube a $35 \pm 1,0$ ° C durante 24 horas. *P. aeruginosa* hidroliza la caseína y produce un pigmento difusible color amarillento a verde. La confirmación de las colonias presuntivas se llevó a cabo mediante la utilización del medio anteriormente enunciado, formulado a partir de partes iguales de agar nutritivo marca Britania®, Argentina, y leche en polvo descremada reconstituida con agua de calidad mili-q estéril de obtención en el laboratorio, que luego de su siembra fue incubado en una estufa “FAL”, modelo “343”, número de serie 1289.

III. Interpretación y cálculo de la densidad: la confirmación no se requiere rutinariamente. En ausencia de confirmación, informe los resultados como el número de presunta *P. aeruginosa* / 100 mL ⁽²⁷⁾.

Análisis estadístico de correlación lineal por el coeficiente de Pearson:

La correlación lineal es un método estadístico que estudia la relación lineal existente entre dos variables, cuantificando como de relacionadas están. El cálculo de la correlación entre dos variables es independiente del orden o asignación de cada variable a X e Y, mide únicamente la relación entre ambas sin considerar dependencias.

A nivel experimental, la correlación se suele emplear cuando ninguna de las variables se ha controlado, simplemente se han medido ambas y se desea saber si están relacionadas. Por norma general, los estudios de correlación lineal preceden a la generación de modelos de regresión lineal. Primero se analiza si ambas variables están correlacionadas y, en caso de estarlo, se procede a generar el modelo de regresión.

Para estudiar la relación lineal existente entre dos variables continuas es necesario disponer de parámetros que permitan cuantificar dicha relación. Uno de estos parámetros es la covarianza, que indica el grado de variación conjunta de dos variables aleatorias.

La covarianza depende de las escalas en que se miden las variables estudiadas, por lo tanto, no es comparable entre distintos pares de variables. Para poder hacer comparaciones se estandariza la covarianza, generando lo que se conoce como coeficientes de correlación. Existen diferentes tipos, de entre los que destacan el coeficiente de Pearson, altamente eficiente cuando se emplean variables cuantitativas que tienen una distribución normal. Es el más sensible a los valores extremos de los tres métodos; Rho (ρ) de Spearman, se emplea cuando los datos son ordinales, de intervalo, o bien cuando no se satisface la condición de normalidad para variables continuas y los datos se pueden transformar a rangos. Es un método no paramétrico; y Tau de Kendall, es otra alternativa no paramétrica para el estudio de la correlación que trabaja con rangos. Se emplea generalmente cuando se dispone de pocos datos y muchos de ellos ocupan la misma posición en el rango.

Todos ellos varían entre +1 y -1. Siendo +1 una correlación positiva perfecta y -1 una correlación negativa perfecta. Se emplean como medida de fuerza de asociación (tamaño del efecto):

- 0: asociación nula.
- 0,1: asociación pequeña.
- 0,3: asociación mediana.
- 0,5: asociación moderada.
- 0,7: asociación alta.
- 0,9: asociación muy alta.

Además del valor obtenido para el coeficiente de correlación, es necesario calcular su significancia. Solo si el p-valor es significativo se puede aceptar que existe correlación, y esta será de la magnitud que indique el coeficiente. Por muy cercano que sea el valor del coeficiente de correlación a +1 o -1, si no es significativo, se ha de interpretar que la correlación de ambas variables es 0, ya que el valor observado puede deberse a simple aleatoriedad. En Pearson, si el p-valor

en menor a 0,05 ($p < 0,05$) se rechaza la hipótesis nula, es decir que la hipótesis planteada es verdadera; y si el p-valor es igual o mayor a 0,05 ($p \geq 0,05$) no se rechaza la hipótesis nula, por lo que hipótesis planteada puede no ser verdadera, sino deberse al azar.

El test paramétrico de significancia estadística empleado para el coeficiente de correlación es el t-test. Al igual que ocurre siempre que se trabaja con muestras, por un lado, está el parámetro estimado (en este caso el coeficiente de correlación) y por otro su significancia a la hora de considerar la población entera. Si se calcula el coeficiente de correlación entre X e Y en diferentes muestras de una misma población, el valor va a variar dependiendo de las muestras utilizadas. Por esta razón se tiene que calcular la significancia de la correlación obtenida y su intervalo de confianza.

La correlación lineal entre dos variables, además del valor del coeficiente de correlación y de su significancia, también tiene un tamaño de efecto asociado. Se conoce como coeficiente de determinación R^2 . Se interpreta como la cantidad de varianza de Y explicada por X. En el caso del coeficiente de Pearson, R^2 se obtiene elevando al cuadrado el coeficiente de correlación.

Coeficiente de Pearson: El coeficiente de correlación de Pearson es la covarianza estandarizada. Es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables originales. Su ecuación difiere dependiendo de si se aplica a una muestra, Coeficiente de Pearson muestral (r), o si se aplica la población Coeficiente de Pearson poblacional (ρ).

El coeficiente de Pearson muestral se define como:

$$r_{xy} = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{(n-1) s_x s_y}$$

$$r_{xy} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}}$$

El coeficiente de correlación muestral representa la covarianza de los valores muestrales estandarizados. Asume valores en el intervalo $[-1;1]$ y el signo indica la dirección de la asociación (valores negativos se producen cuando la tendencia promedio indica que, si un valor en el par observado es más grande que su media, el otro valor es más pequeño que su media) ⁽²⁸⁾.

El coeficiente de Pearson poblacional se define como:

$$\rho_{X,Y} = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y}$$

$$\rho_{X,Y} = \frac{E[(X - \mu_X)(Y - \mu_Y)]}{\sigma_x \sigma_y}$$

Donde:

- σ_{XY} es la covarianza de X e Y
- σ_X es la desviación estándar de la variable X
- σ_Y es la desviación estándar de la variable Y

Para poder aplicar el Coeficiente de Pearson se deben cumplir las siguientes condiciones:

- La relación que se quiere estudiar entre ambas variables es lineal (de lo contrario, el coeficiente de Pearson no la puede detectar).
- Las dos variables deben de ser cuantitativas.
- Normalidad: ambas variables se tienen que distribuir de forma normal. Varios textos defienden su robustez cuando las variables se alejan moderadamente de la normal.

- Homocedasticidad: La varianza de Y debe ser constante a lo largo de la variable X. Esto se puede identificar si en el scatterplot los puntos mantienen la misma dispersión en las distintas zonas de la variable X. Esta condición no la he encontrado mencionada en todos los libros.

El coeficiente de Pearson posee las siguientes características:

- Toma valores entre $[-1, +1]$, siendo +1 una correlación lineal positiva perfecta y -1 una correlación lineal negativa perfecta.
- Es una medida independiente de las escalas en las que se midan las variables.
- No varía si se aplican transformaciones a las variables.
- No tiene en consideración que las variables sean dependientes o independientes.
- El coeficiente de correlación de Pearson no equivale a la pendiente de la recta de regresión.
- Es sensible a valores atípicos (outliers), por lo que se recomienda en caso de poder justificarlos, excluirlos del análisis.

Para interpretar los resultados obtenidos mediante este un método estadístico, además del valor obtenido para el coeficiente, es necesario calcular su significancia. Solo si el p-valor es significativo se puede aceptar que existe correlación y esta será de la magnitud que indique el coeficiente. Por muy cercano que sea el valor del coeficiente de correlación a +1 o -1, si no es significativo, se ha de interpretar que la correlación de ambas variables es 0 ya que el valor observado se puede deber al azar.

En Pearson, se tiene que comparar el p-valor con respecto al valor de significación (valor de significación estadística, por convención $p < 0,05$) o el valor alfa (α) suele ser denominado.

Además de la hipótesis nula, se debe formular de la forma más precisa posible, una hipótesis alternativa. Entonces, si la hipótesis nula cae en zona de rechazo ($p \leq 0,05$), deberíamos aceptar la hipótesis alternativa o de diferencias.

Pearson introduce, además de las pruebas de hipótesis, los conceptos de error tipo I (cometido cuando la hipótesis nula es verdadera y, como consecuencia del contraste, se rechaza), error tipo II (cayendo en él cuando la hipótesis nula es falsa y, como consecuencia del contraste se acepta) y potencia del estudio (probabilidad que tiene la prueba estadística para rechazar una hipótesis nula falsa).

Errores frecuentes en la interpretación del valor p:

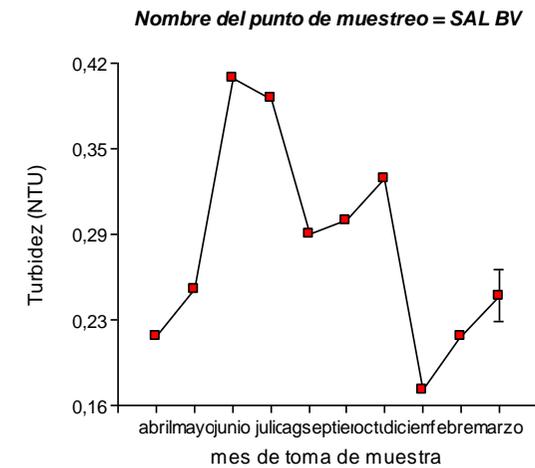
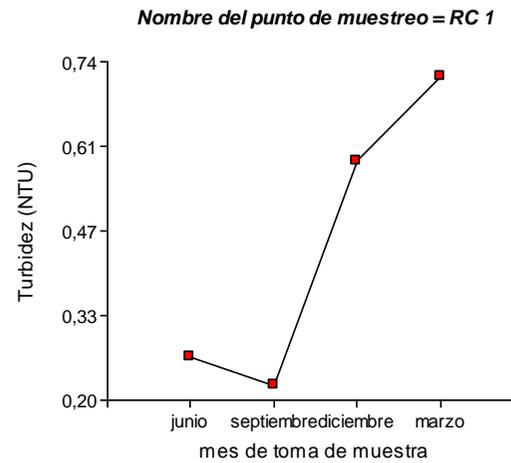
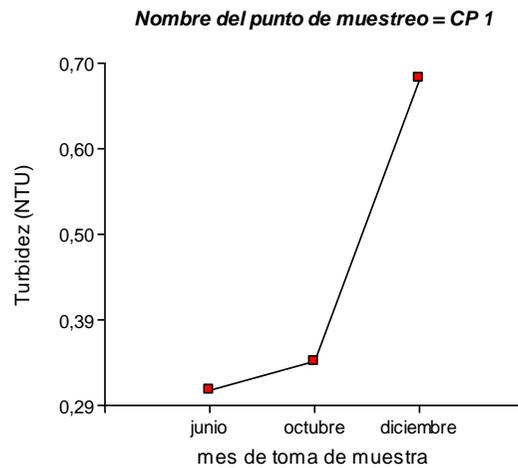
- El p-valor no nos da una probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta, solamente nos permite definir su aceptación o rechazo, confrontándolo con el valor de alfa establecido (posibilidad de cometer error tipo I)
- El p-valor no nos informa la probabilidad de que la hipótesis alternativa sea cierta; de la misma manera que lo anterior, si el valor p es menor que el valor definido como valor de rechazo (generalmente $< 0,05$) significa que, a partir de los datos obtenidos, no podemos aceptar la hipótesis de no diferencias. Pero esto no significa que el valor p asigne una probabilidad de que la hipótesis alternativa sea cierta
- El p-valor con magnitudes muy bajas no es una medida de efecto de la variable estudiada, es decir, el valor p muy bajo no demuestra “mayor efecto” que un valor p cercano a 0,05
- Tampoco debe entenderse que la significación estadística de una determinada prueba es evidencia de efecto, ni lo contrario, no es evidencia de no efecto la falta de significación estadística ($p \geq 0,05$)⁽³⁰⁾

Tablas adicionales resultantes del tratamiento estadístico de los datos:

A continuación, se presentan los gráficos adicionales obtenidos durante el análisis estadístico realizado para cada una de las variables estudiadas, aplicando el Coeficiente de correlación de Pearson.

De estos se pudieron obtener las conclusiones mencionadas en el capítulo correspondiente.

IX. Turbidez



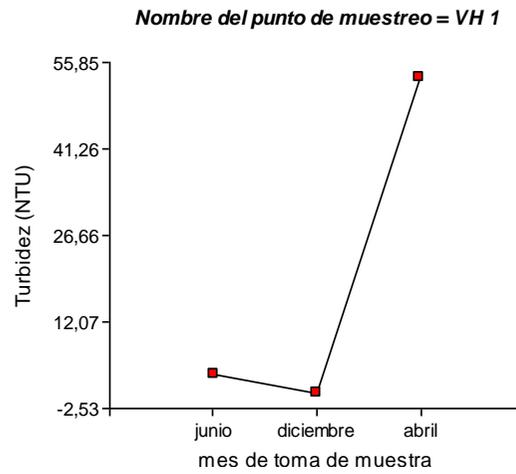
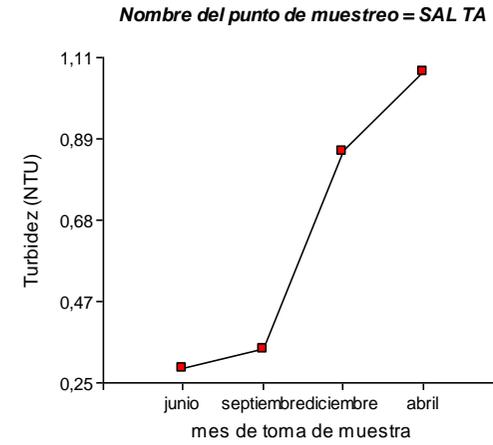
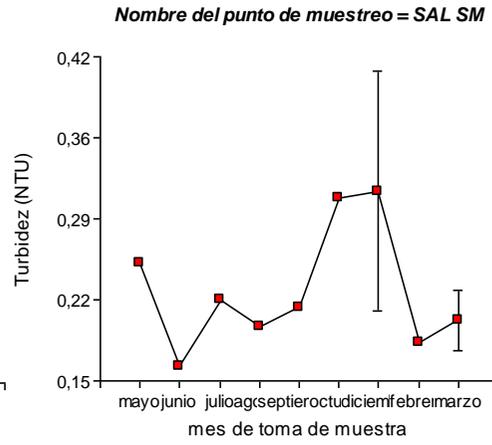
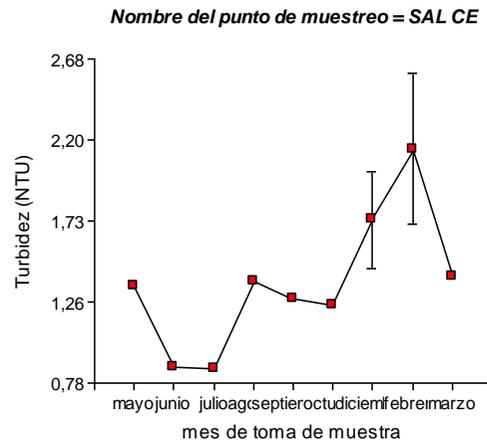
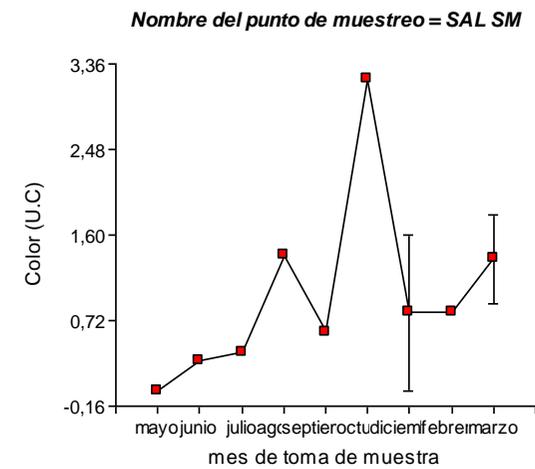
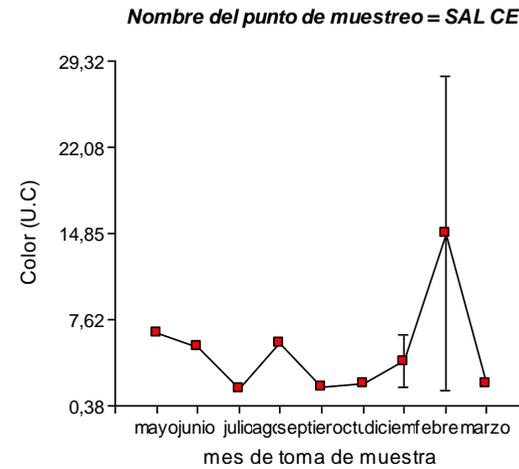
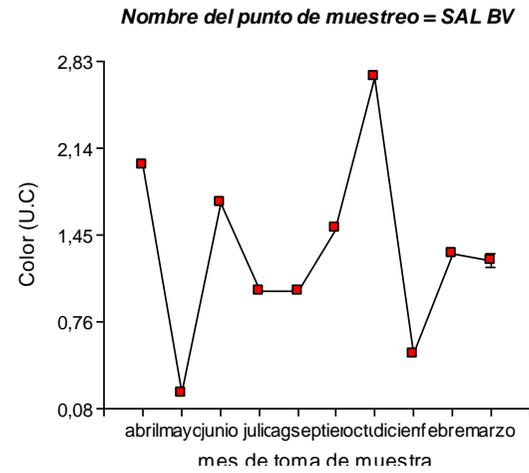
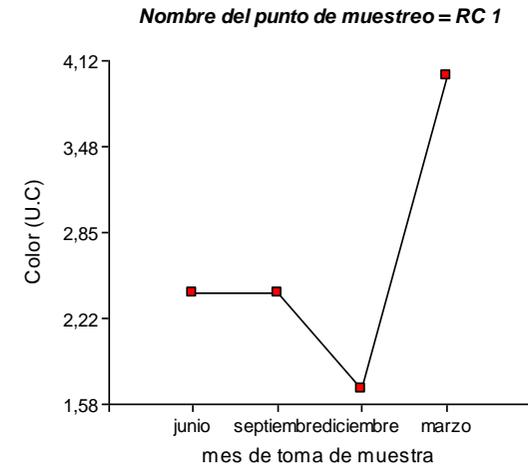
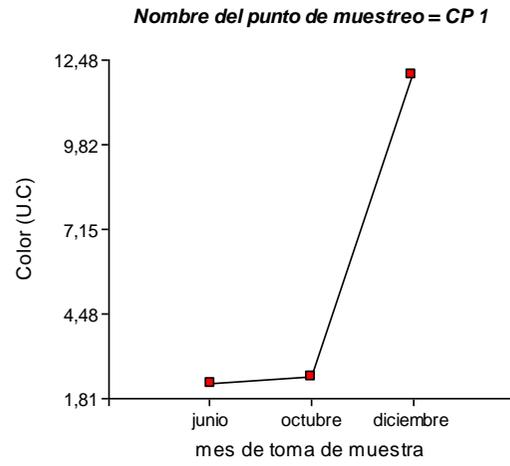
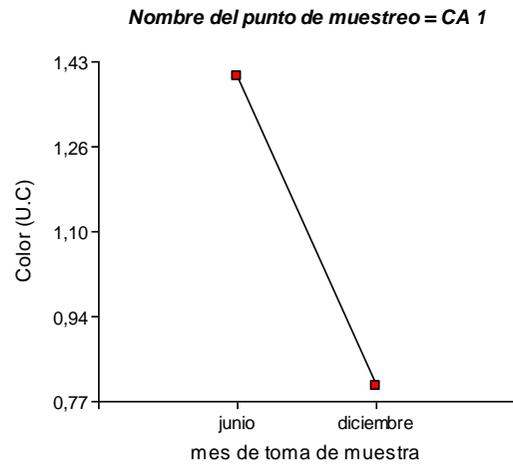


Figura 1: Gráficos adicionales para el parámetro "turbidez"

X. Color



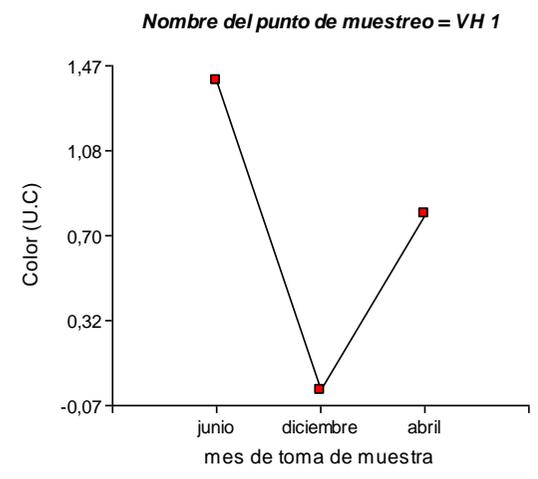
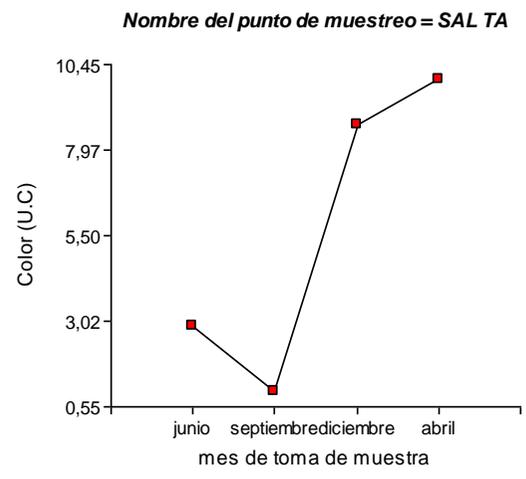
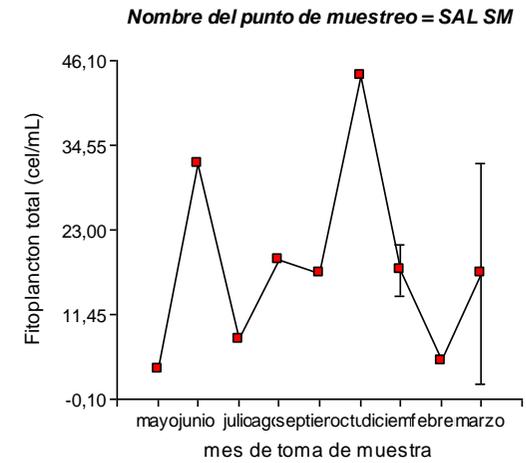
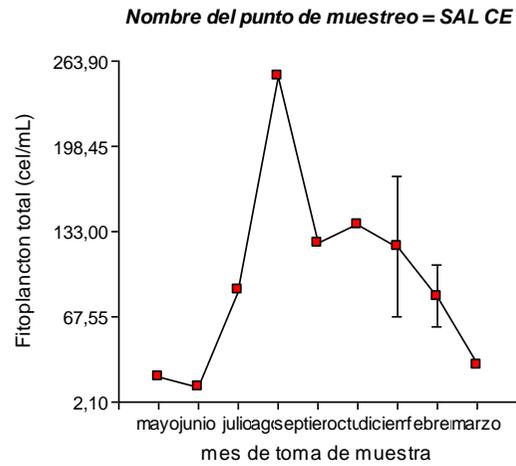
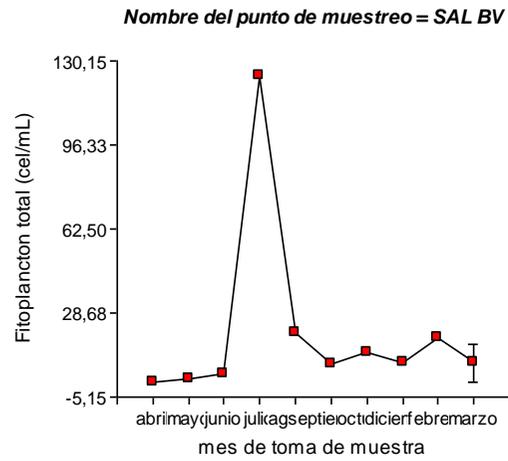
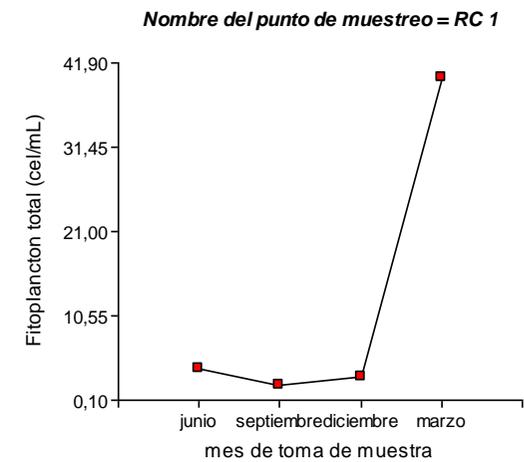
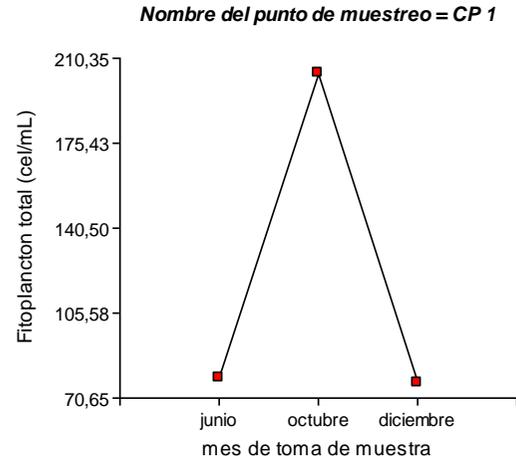
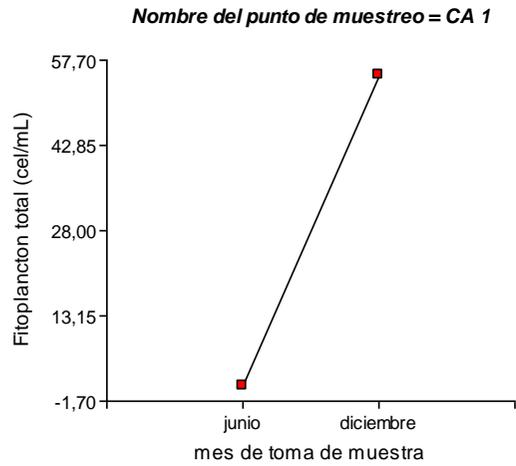


Figura 2: Gráficos adicionales para el parámetro "color"

XI. Fitoplancton



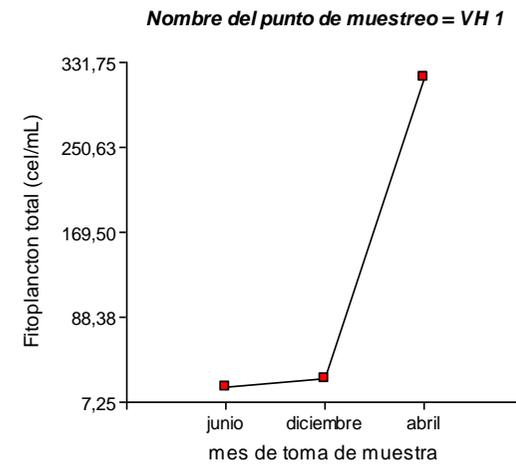
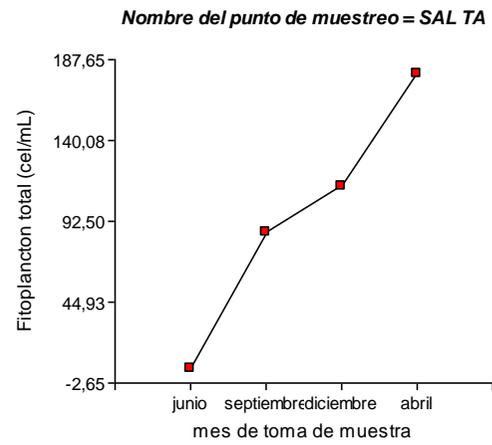


Figura 3: Gráficos adicionales para el parámetro "fitoplancton"

Glosario:

A

- Agar: sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas, utilizada como medio de cultivo, en farmacia, en bacteriología y en ciertas industrias.
- Ambientes lénticos: son cuerpos de agua cerrados que permanecen en un mismo lugar sin correr, ni fluir. Comprenden todas las aguas interiores que no presentan corriente continua; es decir, aguas estancadas sin ningún flujo de corriente, como las lagunas, los esteros y los pantanos. Estos ambientes cambian con el paso del tiempo, disminuyendo su profundidad y aumentando su vegetación hasta la desaparición total del cuerpo de agua. Por lo general, tienen poca profundidad y menor variación de la temperatura.
- Ambientes Lóticos: es el ecosistema de un río, arroyo o manantial, en el cual el movimiento del agua es predominantemente en una dirección, siguiendo el curso que tenga el cuerpo, afectado por factores físicos como: pendiente, caudal, profundidad, sinuosidad, entre otros.
- Anóxia: Condición de agotamiento del oxígeno disuelto en zonas de agua marina, agua dulce o de aguas subterráneas. Esta condición se encuentra generalmente en las áreas con un limitado intercambio de agua y con procesos de eutrofización en progreso.

B

- Bacilo: Bacteria de forma cilíndrica alargada.
- Bloom: Rápida producción durante cortos períodos de tiempo que permite el desarrollo explosivo de plantas y animales.

C

- Cieno: Lodo blando que forma depósito en ríos, y sobre todo en lagunas o en sitios bajos y húmedos.
- Color verdadero: es el fenómeno que produce la elevación de la turbidez de una muestra debido a la presencia de compuestos coloreados que absorben la luz que son causantes de interferencia negativa, es decir, el color del agua debido a las sustancias disueltas que absorben la luz, que causan que las mediciones de turbidez sean bajas.

D

- Dulceaquícola: Relativo o perteneciente al agua dulce, refiriéndose sobre todo a los seres vivos que viven en ella, sean animales o vegetales.

E

- ELISA: la técnica ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas') es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo.
- Endo-LES Agar: Medio de cultivo utilizado para la detección y enumeración de bacterias Coliformes y *E. coli* en agua y alimentos por el método de filtración por membrana.
- Eutrofización: incremento de sustancias nutritivas en aguas dulces de lagos y embalses, que provoca un exceso de fitoplancton. Se refiere específicamente al aporte más o menos masivo de nutrientes inorgánicos que contienen N y P en un ecosistema acuático con la entrada de agua restringida, como por ejemplo en un lago. Un ecosistema eutrofizado es aquel que se caracteriza por una abundancia anormalmente alta de nutrientes (procedentes

normalmente de actividades humanas), de forma que se produce una proliferación descontrolada de algas fitoplanctónicas. En general, en las aguas dulces comienza con un crecimiento de diatomeas y clorofíceas, para acabar con las cianofíceas (o cianobacterias) en su última fase, consumiendo hasta agotar todo el N y P, hasta que este elemento actúa como limitante de la producción primaria. Estas cianobacterias forman una capa en superficie, que impide el paso de la luz solar y la fotosíntesis por debajo de ellas, por lo que la producción primaria no puede existir a mayores profundidades, ocasionando mortandad de la mayoría de las especies animales y vegetales que forman parte de dicho ecosistema.

F

- Filtro de membrana: lámina delgada de diversos materiales, generalmente celulósicos, con diferentes tamaños de poro, a través de los cuales se hace pasar el agua ya sea por gravedad o por acción de un vacío suave, y en las que quedan retenidos los diferentes contaminantes de la misma. Para la aplicación de técnicas microbiológicas por filtración por membrana generalmente se utilizan membranas de nitrocelulosa, con un tamaño de poro de 0,45 μm .

- Floculación: La floculación es un proceso químico mediante el cual, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, disminuyendo la superficie de contacto con la fase dispersante, y aumentando la masa de la partícula en suspensión, hasta que la misma, por su propio peso decanta.

- Frústula: es la pared celular dura y porosa de la capa externa, o teca, de las diatomeas. La frústula está compuesta casi en su totalidad por sílice (óxido de sílice hidratado) proveniente del ácido silícico, y recubierta con una capa de materia orgánica, compuesta por varios tipos de polisacáridos. La estructura de la frústula está usualmente compuesta de dos secciones superpuestas (conocidas como valvas). La valva superior se denomina epiteca y es ligeramente más grande y se solapa con la valva inferior, la hipoteca. La unión entre las dos valvas es soportada por bandas de sílice (bandas de cintura) que mantienen las dos valvas juntas. El solapamiento permite cierto margen de expansión interna adicional y es

esencial durante el proceso de reproducción cuando la célula se amplía para permitir la formación de dos nuevas valvas, como en la división de la célula madre.

La frústula también contiene muchos poros y hendiduras que proveen el acceso de las diatomeas a su medio externo para procesos tales como el desecho de residuos y la secreción mucilágena, entre otras.

G

- Gram: Es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram (1853-1938), que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias grampositivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias gramnegativas a las que se visualizan de color rosado y rojo.

H

- HPC agar: Heterotrophic plate count o recuento de placas heterotróficas.

I

-

J

-

K

- King A: Medio de cultivo que permite la detección de la síntesis de piocianina, un pigmento elaborado específicamente por *Pseudomonas aeruginosa*. Usado en paralelo con el medio King B, puede usarse para guiar en la identificación de este patógeno.

- King B: Medio de cultivo que permite la detección de la síntesis de pioverdina, un pigmento producido por *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas*. Usado en paralelo con el medio King A, puede usarse para guiar en la identificación de este patógeno.

L

-

M

- m-Endo Agar: Medio de cultivo utilizado para la detección y enumeración de bacterias Coliformes y *E. coli* por el método de filtración por membrana.

- m-HPC agar: membrane – Heterotrophic Plate Count Agar o recuento de placas heterotróficas adaptado a método de filtración por membrana.

- m-PA-c agar: Medio de cultivo empleado Para la recuperación selectiva de *Pseudomonas aeruginosa* en agua por el método de filtración por membrana.

- Medio Luria: El caldo Luria (Luria Bertani LB) o caldo LB contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. El cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico. MODO DE USO: Inocular el medio de cultivo con la muestra de ensayo. Incubar 24 h a 35°C. Para identificación posterior de microorganismos: De los cultivos que muestran desarrollo, efectuar resiembras en medios de cultivo selectivos por estría cruzada. El CALDO LURIA (Luria Bertani LB) sirve como medio de enriquecimiento.

N

-

Ñ

-

O

- Oligotrófia: Propiedad de las aguas de lagos profundos de alta montaña, con escasa cantidad de sustancias nutritivas y poca producción de fitoplancton.

P

- PCA: Plate Count Agar o Agar de Recuento en Placa. Medio de cultivo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. También es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas.

- PCR: Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés (la reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica de la biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una sola copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar, con una probabilidad muy alta, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado

- Placa de Petri: es un recipiente redondo, de cristal, para que se pueda colocar encima y cerrar el recipiente, aunque no de forma hermética. Es parte de la colección conocida como «material de vidrio». Se utiliza en Microbiología para cultivar células, observar la germinación de las semillas o examinar el comportamiento de microorganismos.

Q

-

R

-

S

- Sistema de secreción tipo III: conocido por sus siglas en inglés como TTSS (Type Three Secretion System), en bacterias patógenas permite secretar proteínas efectoras dentro de las células eucariotas del huésped siendo esencial para el desarrollo de la enfermedad ⁽³⁶⁾.

T

- Taxón: Grupo de una clasificación científica.
- Taxonomía: Ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación, generalmente científica; se aplica, en especial, dentro de la biología para la ordenación jerarquizada y sistemática de los grupos de animales y de vegetales.
- Tubos de Nessler: consisten en cilindros de vidrio con un volumen fijo, hechos con fondo ópticamente plano. En las paredes hay marcas del volumen de trazo nominal y posiblemente una marca a medio camino.

· TSA: (Tipteína Soya Agar) Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo de una gran variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos.

U

-

V

-

W

-

X

-

Y

-

Z

-

Citas Bibliográficas

- (1) Guías para la calidad del agua potable PRIMER APÉNDICE A LA TERCERA EDICIÓN Volumen 1
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf (accessed Nov 11, 2018).
- (2) 06: recursos hídricos y contaminación del agua
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/RecursosHidricosycontaminacion_25154.pdf (accessed Jan 05, 2019).
- (3) Libro electrónico: CIENCIAS DE LA TIERRA Y DEL MEDIO AMBIENTE; Tema11: Contaminación del agua, origen de la contaminación de las aguas
<http://www4.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/11CAgu/120ProcC.htm>
(accessed Jan 05, 2019).
- (4) Procesos de contaminación del agua: Contaminación de las aguas por nitratos y efectos sobre la salud
https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud_5af065353fcf6_contaminacion_nitratos2.pdf (accessed Jan 05, 2019).
- (5) *Análisis de Aguas*, 2020. [online], Jaén, Andalucía, España.
- (6) *2130 B, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017, 23. Washington DC: Laura L. Bridgewater.
- (7) *2120 B, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017, 23. Washington DC: Laura L. Bridgewater.
- (8) MARTÍNEZ DE FABRICIUS, ANA L., E. LUQUE, MARÍA, LOMBARDO, DANIELA and BRUNO, E., 2007, *Potamoplancton en la cuenca media del Río Cuarto (Cordoba, Argentina)* [online]. 1. Madrid, España: ALM de Fabricius. [Accessed 20 March 2019]. Available from:
<https://www.limnetica.com/documentos/limnetica/limnetica-26-1-p-25.pdf>
- (9) *10200 A - F, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017, 23. Washington DC: Laura L. Bridgewater.

- (10) ARANDA, O., CRETТАZ-MINAGLIA, M.C., JUÁREZ, I., SEDAN, D., ROSSO, L., VENTOSI, E., ANDRINOLO, D. and GIANNUZZI, L., [no date], *Evaluación del uso de cloro y ozono para la remoción de microcistina en agua destinada al consumo* [online]. La Plata, Buenos Aires, Argentina: AIDIS Argentina. [Accessed 20 April 2020]. Available from:
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60752/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- (11) *Guías para la calidad del agua potable PRIMER APÉNDICE*, 2006. [online], 3. Ginebra, Suiza: OMS.
- (12) VERGARA, YOLANDA, MOYA, ARMANDO, PELEATO SÁNCHEZ, MARÍA LUISA, SEVILLA, EMMA and LÓPEZ, SARA, 2020, *INFORME CIENTÍFICO-TÉCNICO NUEVOS RIESGOS PARA EL AGUA POTABLE: MICROCISTINA* [online]. 1. [Accessed 20 March 2019]. Available from:
https://www.aragon.es/documents/20127/674325/CESA_INFORME_TECNICO_CIENTIFICO.pdf/13774a6d-e120-9573-d2bf-3ff296a13761
- (13) PÉREZ, DS, SORACI, AL and TAPIA, MO, 2008, *CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS: ROL DE LAS MICROCISTINAS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL Y SU DETECCIÓN EN MUESTRAS DE AGUA* [online]. Tandil, Buenos Aires, Argentina: Denisa S. Pérez. [Accessed 20 April 2020]. Available from:
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11209/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y+
- (14) ARANDA, O., CRETТАZ-MINAGLIA, M.C., JUÁREZ, I., SEDAN, D., ROSSO, L., VENTOSI, E., ANDRINOLO, D. and GIANNUZZI, L., [no date], *Evaluación del uso de cloro y ozono para la remoción de microcistina en agua destinada al consumo* [online]. La Plata, Buenos Aires, Argentina: AIDIS Argentina. [Accessed 20 April 2020]. Available from:
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60752/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- (15) SIMOENS, MACARENA, 2020, *MICROCISTINA – LR EN EL URUGUAY* [online]. Montevideo, Uruguay: Macarena Simoens. [Accessed 20 April 2020]. Available from:
https://catalogo.latu.org.uy/opac_css/doc_num.php?explnum_id=138

- (16) Chorus, Ingrid & Bartram, Jamie. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management / edited by Ingrid Chorus and Jamie Bertram. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42827>
- (17) MINISTERIO DE AGUA, AMBIENTE Y SERVICIOS PÚBLICOS, SECRETARÍA DE RECURSOS HÍDRICOS, 2016, *Resolución 174/16 Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas Para Bebida de Córdoba*. Córdoba: Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos.
- (18) PASSALACQUA, NANCY and CABRERA, JOSEFINA, 2014, *ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS; METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL; MICROORGANISMOS INDICADORES* [online]. 3. Buenos Aires: Fernando Trinks. INAL - ANMAT. [Accessed 10 January 2019]. Available from: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I_II.pdf
- (19) MOSCHIONE, ELEONORA, AMÉNDOLA, VIVIANA, CALDARARO, ANA MARÍA, GAUNA, GUILLERMO and SAUBIDET, ALEJANDRO, 2007, *CONTROL BACTERIOLÓGICO DE AGUAS*. Archivos de texto digital (.doc). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. http://www.osmgp.gov.ar/osse/documentos/doc/Material_Bibliografico_Curso_Bacteriologia.doc: Archivos de texto digital (.doc)
- (20) 9215 B, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017, 23. Washington DC: Laura L. Bridgewater.
- (21) Recuento de Coliformes Totales: Filtración a través de membrana, *Coli.usal.es* [online] http://coli.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html (accessed Mar 08, 2019).
- (22) MINISTERIO DE SALUD, PRESIDENCIA DE LA NACIÓN, 2017, *Módulo II: Directrices sanitarias para enteropatógenos y microorganismos oportunistas en agua ambiente, Directrices sanitarias para uso seguro de aguas recreativas (Resolución Ministerial 125/2016)*. Departamento de Salud Ambiental, Dirección Nacional de Determinantes de la Salud -DINADESA-, Ministerio de Salud de la Nación.

- (23) 9222 D, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017, 23. Washington DC: Laura L. Bridgewater.
- (24) IRAM 29107-1:2006. Calidad ambiental – Calidad de agua. Detección y recuento de bacterias coliformes y de *Escherichia coli*. Parte 1- Método de filtración por membrana para agua con bajo contenido de flora bacteriana. Buenos Aires, Argentina: IRAM, 03/06/2015.
- (25) ISO 9308:2014-1. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. ISO, 09/2014.
- (26) MARTÍN, IRENE, 2004, *Riesgo sanitario por presencia de Pseudomonas aeruginosa en el agua para consumo*. Licenciatura en Ecología Urbana. Universidad Nacional de General Sarmiento.
- (27) 9213 E, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2017, 23. Washington DC: Laura L. Bridgewater.
- (28) DI RIENZO, JULIO, BALZARINI, MÓNICA, GONZALEZ, LAURA, CASANOVES, FERNANDO, TABLADA, MARGOT and ROBLEDO, CARLOS WALTER, 2008, *InfoStat® software estadístico*. Córdoba Capital, Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- (29) AMAT RODRIGO, JOAQUÍN, 2020, Correlación lineal y Regresión lineal simple. *Cienciadedatos.net* [online]. 2020. [Accessed 21 April 2020]. Available from: https://www.cienciadedatos.net/documentos/24_correlacion_y_regresion_lineal
- (30) DIAZ BALLVE, LADISLAO and RÍOS, FERNANDO, 2018, *El valor p. Interpretación, orígenes y su utilización actual* [online]. [Accessed 21 April 2020]. Available from: <http://file:///D:/Usuario/Downloads/593-Article%20Text-2950-1-10-20180918.pdf>
- (31) Las cepas de *Escherichia coli*, [no date]. [online] Available from: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html#targetText=Las%20cepas%20de%20Escherichia%20coli,%20y%20enteroagregativa%20\(EAEC\)](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html#targetText=Las%20cepas%20de%20Escherichia%20coli,%20y%20enteroagregativa%20(EAEC)).

- (32) RODRÍGUEZ-ANGELES, GUADALUPE, 2020, Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Scielo.org.mx* [online]. 2020. [Accessed 9 May 2019]. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011
- (33) ROCK, CHANNAH and RIVERA, BERENISE, 2014, *La Calidad del Agua, E. coli y su Salud* [online]. 1. Tucson, Arizona, Estados Unidos de Norteamérica: Channah Rock. [Accessed 9 June 2019]. Available from: <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1624s.pdf>
- (34) *Pseudomonas aeruginosa*, [no date]. [online], Available from: http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Pseudomonas.pdf
- (35) ASALE, RAE, 2020, Diccionario de la lengua española | Edición del Tricentenario. «*Diccionario de la lengua española*» - Edición del Tricentenario [online]. 2020. [Accessed 23 March 2020]. Available from: <https://dle.rae.es/>
- (36) MORENO, MANUEL GUILLERMO, 2020, EL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (TTSS) Y ALGUNOS DETERMINANTES DE VIRULENCIA EN R. solanace. *Microbiología de Plantas* [online]. 2020. [Accessed 20 April 2020]. Available from: <https://microplantas.wordpress.com/2009/03/10/el-sistema-de-secrecion-tipo-iii-ttss-y-algunos-determinantes-de-virulencia-en-r-solanace/>

