

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS AGRICOLAS CON ENFASIS
EN MANEJO DE SUELOS Y AGUA**

TESIS DE MAESTRIA

***IMPACTO DEL CAMBIO CLIMATICO SOBRE LA PREVALENCIA DE
INDICADORES MICROBIOLOGICO, PATOGENOS Y PARAMETROS FISICO
QUIMICOS DE AGUAS SUPERFICIALES DEL RIO LA VILLA USADAS PARA
ACTIVIDADES AGRICOLA Y HUMANA***

POR:

**ALEXIS DE LA CRUZ LOMBARDO
Cédula: 8-707-1000**

**Tesis presentada como uno de los Requisitos para obtener el Grado de Maestro
en Ciencias Agrícola con Énfasis en Manejo de Suelo y Agua**

Panamá, República de Panamá

2018

ÍNDICE GENERAL

Agradecimiento y Dedicatoria	Págs.
Resumen.....	xvi
Abstract.	xvii
Introducción.....	xviii

CAPÍTULO I

Revisión de la Literatura

1.1 Antecedentes	15
1.2 Calidad Microbiológica del agua.....	18
1.3 Calidad del agua del Río La Villa.....	20
1.4 Contaminantes de la Cuenca del Río La Villa.....	20
1.5 Indicadores de Calidad del Agua.....	20
1.6 Bacterias Indicadoras.....	21
1.6.1 Coliformes Totales	21
1.6.2 Coliformes Fecales Termotolerantes	22
1.6.2.1 <i>Escherichia coli</i>	23
1.6.3 Estreptococo fecal	23
1.6.3.1 Hábitat normal de los Estreptococos.....	23
1.6.3.2 Valor de los Estreptococos.....	24
1.6.4 Los Microorganismos Anaerobios.....	25
1.7 Relación entre patógenos e indicadores.....	25
1.8 Patógenos en Agua.....	26
1.8.1 Género <i>Salmonella spp.</i>	26
1.8.1.1 Enfermedades producida por el género <i>Salmonella spp.</i>	27
1.8.1.1.1 Salmonelosis.....	27
1.8.2 Género <i>Vibrio spp.</i>	27
1.8.2.1 <i>Vibrio cholerae</i>	28
1.8.2.1.1 Enfermedades producidas por el género <i>Vibrio spp.</i>	29
1.8.2.1.1.1 Cólera.....	29
1.9 Técnica de detección e identificación de indicadores y patógenos.....	29
1.10 Técnica de Filtro de Membrana.....	30
1.11 Técnica para concentración y evaluación de patógenos en agua.....	30
1.11.1 Enriquecimiento en medio selectivo para <i>Salmonella spp.</i>	31
1.11.2 Enriquecimiento en medio selectivo para <i>Vibrio spp.</i>	31
1.11.3 Aislamiento en Medios Selectivos, Agar XLD y <i>Salmonella-Shigella</i> para <i>Salmonella spp.</i>	32
1.11.3.1 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).....	32
1.11.3.2 Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) para <i>Vibrio</i> <i>spp.</i>	32
1.12 Aislamiento e Identificación Bacteriana.....	32
1.13 Parámetros Físicos Químicos del Agua.....	33
1.13.1 Turbiedad.....	33
1.13.2 Temperatura.....	33
1.13.3 pH.....	33
1.13.4 La Conductividad.....	33
1.13.5 El Oxígeno Disuelto.....	34

1.13.6 Alcalinidad.....	34
1.14. Normas y legislación para aguas superficiales de ríos.....	34
1.15. Normas Panameñas para aguas superficiales.....	35

CAPÍTULO II

Aspectos Metodológicos

2.1 Ubicación del estudio.....	38
2.2 Diseño de la Investigación.....	39
2.3 Variables de la Investigación.....	40
2.3.1 Nivel de muestreo (alto-medio-bajo).....	40
2.3.2 Época Seca.....	40
2.3.3 Época Lluviosa.....	40
2.3.4 Muestreo.....	40
2.3.5 Parámetros Microbiológicos indicadores y patógenos.....	40
2.4 Metodología usada en la investigación.....	41
2.4.1 Muestras en Campo.....	41
2.4.2 Técnicas para el procesamiento microbiológico de muestras.....	42
2.4.3 Técnicas para Detección de Anaerobios.....	42
2.4.4 Asilamiento y Detección de microorganismos patógenos.....	43
2.4.5 Enriquecimiento selectivo para microorganismos patógenos.....	43
2.4.6 Aislamiento selectivo para microorganismos patógenos.....	43
2.4.7 Aislamiento de colonias sospechosas.....	44
2.4.8 Identificación Bioquímica.....	44
2.5 Análisis Estadísticos.....	44

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión.....	46
Conclusiones y Recomendaciones.....	72-74
Bibliografía.....	75
Anexo	81

ÍNDICE DE CUADROS

	Págs
Cuadro No. 1. Normas primarias anuales de calidad ambiental en Aguas Superficiales con contacto y sin contacto directo.....	35
Cuadro No. 2. Niveles de la calidad de las aguas para uso recreativo con y sin contacto.....	36
Cuadro No. 3. Análisis de varianza: conteo UFC (Unidades formadoras de Colonias) Coliformes Totales en las dos época del año.....	47
Cuadro No. 4. Análisis de varianza: conteo de colonias (UFC/100 ml) Coliformes Fecales en las dos épocas del año (seca y lluviosa).....	48
Cuadro No. 5. Análisis de varianza: conteo de colonias (UFC/100 ml) Estreptococos fecales en las dos época del año (seca y lluviosa).....	50
Cuadro N°6 Aislamientos de bacterias patógenas en la época seca y lluviosa.....	58
Cuadro N°7 Distribución de la cantidad de bacterias patógenas <i>Salmonella spp</i> y <i>Vibrio spp</i> por las época.....	59
Cuadro N°8 Distribuciones de los conteos para las bacterias patógenas <i>Salmonella spp</i> y <i>Vibrio spp</i> por sitio de muestreo	60
Cuadro No.9 Resultados obtenidos en la época seca, para las Bacterias Indicadores, en los tres niveles de la Cuenca del Río La Villa, entre los meses de enero, febrero y marzo (2016) y octubre, noviembre y diciembre (2016).....	82
Cuadro No.10 Resultados obtenidos sobre el crecimiento de Bacterias Indicadoras en la época lluviosa, para los tres niveles del río, en la Cuenca del Río La Villa entre los meses enero, febrero, marzo (2016) y octubre, noviembre, diciembre (2016).....	83
Cuadro No. 11 Prueba de rangos múltiples para los Coliformes Totales, en las dos épocas del año.....	84
Cuadro No.12 Prueba de rangos múltiples para Coliformes fecal, en las dos épocas del año.....	84
Cuadro No.13 Prueba de rangos múltiples para Estreptococos en las dos épocas....	85
Cuadro No.14 Prueba de rangos múltiples para Anaerobios en las dos épocas.....	85

Cuadro No.15. Prueba de rangos múltiples para coliformes Totales en los diferentes niveles de la cuenca.....	85
Cuadro No.16 Prueba de rango múltiple para Coliformes Fecal en los tres niveles del río.....	85
Cuadro No. 17 Prueba de rango múltiple para Estreptococos en los diferentes niveles de la cuenca.....	86
Cuadro No.18 Prueba de rangos múltiples para Anaerobios en los tres niveles del río.....	86
Cuadro No. 19 Datos del pH y la Temperatura, tomas en los tres puntos de muestreo durante la época seca.....	86
Cuadro No.20 Datos del pH y Temperatura en los tres puntos de muestreo en la época lluviosa.....	87
Cuadro No.21 Localización de los puntos de monitoreo.....	87
Cuadro No.22. Clasificación de la calidad del agua según las Normas Internacionales tomadas en cuenta.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs
Figura No.1. Ubicación de los puntos altos, medio y bajo del monitoreo realizado al Rio La Villa	39
Figura No.2 Localización geográfica de los sitios bajo estudio en la investigación parte media y baja de la cuenca del Rio La Villa, en Azuero.....	39
Figura No.3 Determinación de Bacterias Coliformes totales para ambas épocas durante el estudio	47
Figura No.4 Diferencias significativa de Coliformes entre la época seca y lluviosa.....	48
Figura No.5 Determinación de Bacterias coliformes fecales (Termotolerantes) para ambas épocas.....	49
Figura No.6 Determinación de Streptococcus fecales para ambas épocas del año...50	
Figura No. 7 Ocurrencia de <i>Streptococcus</i> sp., en los diferentes sitios de muestreos a lo largo del rio La Villa, desde marzo del 2016 a marzo de 2017.....	51
Figura No.8 Recuento de Anaerobios para ambas épocas del año.....	51
Figura No.9 Variación del Conteo de Coliformes entre los puntos del rio y época...52	
Figura No.10 Evaluacion de bacterias indicadoras para la parte alta del rio.....	53
Figura No.11 Variación del Conteo de Coliformes fecales (Termotolerantes), entre las épocas y puntos de monitoreo del rio La Villa.....	53
Figura No.12 Evaluacion de bacterias indicadoras en la parte media del rio, en época seca	54
Figura. No.13 Evaluacion de bacterias indicadoras en la parte baja del rio.....	55
Figura No.14 Recuento de Bacterias indicadoras en la parte alta del rio para la época lluviosa.....	56
Figura No.15 Recuento de bacterias indicadoras en el nivel medio del rio para la época lluviosa.....	56
Figura No.16 Recuento de Bacterias indicadores en la parte baja del rio, para la época lluviosa.....	57

Figura No.17 Análisis de Comglomerado (WARD, BRAY-COURTIS) para <i>Streptococcus</i> spp por sitio de muestreo.....	57
Figura No.18 Distribución de la cantidad de bacterias patógenas <i>Salmonella spp</i> y <i>Vibrio spp</i> .por nivel del río.....	58
Figura No.19 Aislamiento de bacterias patógenas en la época seca y lluviosa.....	59
Figura No.20 Distribución de la cantidad de bacterias patógenas <i>Salmonella spp</i> y <i>Vibrio spp</i> para las época seca y lluviosa.....	60
Figura No.21 Comparación de los niveles de coliformes totales en las tomas de agua Rio La Villa, de las plantas potabilizadora para ambas épocas.....	61
Figura No.22. Comparación de los niveles de coliformes fecales en las tomas de agua de las Potabilizadoras Roberto Reyna y Rufina Alfaro para ambas épocas.....	62
Figura No.23 Ocurrencia de géneros bacterianos asilados en la toma de agua de la Potabilizadora Ing. Roberto Reina durante las épocas.....	63
Figura No.24 Ocurrencias de géneros bacterianos asilados en la toma de agua de la Potabilizadora Rufina Alfaro durante las épocas.....	64
Figura No.25 Evaluación del pH a nivel de los diferentes puntos de muestreo de la cuenca del Río La Villa en la época seca.....	65
Figura No.26 Evaluación del (pH) a nivel de los diferentes puntos de muestreo de la cuenca del Río La Villa en la época lluviosa.....	65
FiguraNo.27 Valores del pH por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa	66
Figura No.28 Evaluación de la temperatura en los diferentes, niveles de muestreo en la cuenca del río La Villa en la época lluviosa.....	66
Figura No.29 Evaluación de la temperatura en los diferentes niveles de muestreo en la cuenca del rio La Villa, para la época seca.....	67
Figura No.30 Valores de la temperatura por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa desde enero de 2016 a diciembre de 2016.....	67
Figura No.31 Porcentaje de saturación de oxígeno, por mes de muestreo, a lo largo del río La Villa, desde enero de 2016 a diciembre de 2016.....	68
Figura No.32 Valores de la alcalinidad, por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa desde enero de 2016 a diciembre de 2016.....	68

Figura No.33 Valores de la turbiedad, por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa desde enero de 2016 a diciembre de 2016.....	69
Figura No.34 Valores de la conductividad por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa, desde enero de 2016 a diciembre de 2016.....	69
Figura No.35 Comparación entre las Bacterias Indicadoras y el pH durante las dos épocas del año.....	70
Figura No.36 Comparación entre Bacterias Indicadoras y la temperatura en las dos épocas del año.....	70
Figura No.37 Análisis de conglomerado (WARD, BRAYT-COURTIS) para demostrar si existen zonas a lo largo del río La Villa.	71
Figura No.38 Crecimiento de colonias positivas para Coliformes Totales en agar Endoles.....	88
Figura No.39 Interpretación de colonias positivas para Estreptococos en agar KF para Estreptococos.....	88
Figura No.40 Punto alto de la cuenca en la reserva Forestal el Montuoso, Tres puntas.....	89
Figura No.41 Punto medio de la cuenca del Río La Villa (La Taguara, Macaracas, Los Olivos).....	89
Figura No.42 Parte Baja de la cuenca del Río La Villa. A su izquierda represa Las Cabras y a su derecha El Higuierón detrás de la represa Nestlé.....	
Figura No.43 Punto medio de la cuenca, durante el muestreo en la época lluviosa..	90
Figura No.44 Algunas fuentes puntuales de contaminación al río La Villa, durante las giras de la investigación.....	90
Figura No.45 Toma de agua de las plantas potabilizadora Rufina Alfaro, con actividad agrícola.....	91
Figura No.46 Evaluación físico química y microbiológica de las muestras de agua..	91
Figura No.47 Toma y conservación de muestra de agua en el campo.....	92
Figura No.48 Técnica de Filtración para los análisis microbiológicos usados en la investigación.....	92
Figura No.49 Flujograma de la Metodología aplicada para la Evaluación de Indicadores Bacterianos y Patógenos partir de Muestras de Agua del río La Villa	93

Agradecimientos y Dedicatoria

Agradezco a Dios Padre Todopoderoso a la Virgen del Carmen, mi madre, por darme la fortaleza, salud y sabiduría necesaria, para lograr concluir esta investigación, por otro lado debo un eterno agradecimiento a la profesora Martha de Von Chong, docente del Centro Regional Universitario de Coclé y docente del programa de la maestría, por darme la oportunidad de ser mi asesora y evaluar esta investigación, , a los profesores Ezequiel Villareal y Nazario Rivera y todos los profesores del programa de la Maestría mil bendiciones.

Dedico el trabajo a todos aquellos deseosos de aprender y descubrir más allá de los que puede plantear esta investigación

RESUMEN

El impacto que ha tenido el cambio climático en la seguridad alimentaria y la agricultura, ha dejado una repercusión en el deterioro de la calidad del agua, como consecuencia de la presencia de indicadores microbianos y patógenos, es por ello que para esta investigación se planteó la necesidad de evaluar el efecto del cambio climático sobre la prevalencia de indicadores microbianos, patógenos y factores físicos químicos en aguas superficiales del río La Villa, en su parte alta, media y baja, durante dos épocas del año, seca y lluviosa del 2016. Se utilizó una metodología basada en la determinación de indicadores microbiológicos de agua como coliformes totales, coliformes termotolerantes, *Streptococcus* spp. , y *Anaerobios* spp., mediante la técnica de filtro de membrana, además del aislamiento de patógenos asociados (*Vibrio* spp. y *Salmonella* spp) por cultivo de enriquecimiento y uso de medios selectivos, asociados a la medición de parámetros físico- químicos; como pH, temperatura, turbiedad, oxígeno disuelto, conductividad y alcalinidad, en cada sitio de muestreo. Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de varianza, con el cual se determinó diferencias significativas siendo la época seca con mayor ocurrencia de coliformes termotolerantes, mientras que en la época lluviosa hubo mayor ocurrencia de coliformes totales y *Streptococcus*, que coliformes termotolerantes y anaerobios, lo cual no fue significativo, a nivel de los puntos de captación de las potabilizadoras de Azuero, arrojaron que hay gran variedad y diversidad de microbiota asociada. De acuerdo a la asociación de los indicadores con las bacterias patógenas, se encontró una mayor ocurrencia de esta últimas para la época seca con un valor de 56.1% y una probabilidad de 0.432, y con respecto al nivel del río, la parte media, se aislaron con mayor frecuencia (65.9%), de esta manera el patógeno con mayor aislamiento lo fue *Salmonella* spp., con una distribución de 16%, mientras que *Vibrio cholera* de 8%. De igual forma, los análisis estadísticos mediante la prueba de Duncan indican que hay diferencias entre los niveles del río, siendo el nivel bajo el que registró mayor ocurrencia de coliformes totales y termotolerantes; en tanto que la ocurrencia de *Streptococcus* fue mayor en la parte alta. El pH y temperatura se mantuvieron constantes para ambas épocas, y pocas variaciones en los otros parámetros físicos químicos. Se concluye que el crecimiento de bacterias indicadoras en la Cuenca del Río La Villa es altamente significativo para las dos épocas, con diferencias entre los puntos de muestreo y predominio en el caso de patógenos, como *Salmonella* spp.

Palabras Claves: Coliformes totales, Coliformes termotolerantes, *Streptococcus*, *Anaerobios*, *Salmonella* spp. *Vibrio* spp, parámetros físico químicos, época seca, época lluviosa.

Abstract

The impact that climate change has had on food security and agriculture, has left an impact on the deterioration of the quality of water, as a result of the presence of pathogenic microbial indicators, so that for this research is He raised the need to evaluate the effect of climate change on the prevalence of pathogenic microbial indicators and chemical physical factors in surface waters of the rio La Villa, to the high, medium and low, during two seasons, dry and rainy in the 2016 was used a methodology based on the determination of water microbiological indicators such as total coliforms, coliforms thermotolerant, Streptococcus spp. and Anaerobes, using the technique of membrane, as well as the isolation of pathogens associated filter (Vibrio spp., and Salmonella spp.) for enrichment and growing use of selective media, associated with the measurement of physico - chemical parameters; as pH, temperature, turbidity, dissolved oxygen, conductivity and alkalinity, in each sampling site. The analysis of variance, which was determined significant differences being the time dry with greater occurrence of thermotolerant coliforms, while during the rainy season there was a greater occurrence of coliforms was used for data analysis and Streptococcus, Thermo-tolerant coliforms and anaerobes, which was not significant, the Azuero water catchment points level, showed that there is great variety and diversity of associated microbiota. According to the Association of indicators with pathogenic bacteria, is found a higher occurrence of this latest for the dry season with a value of 56.1% and a probability of 0.432, and with respect to the level of the River, the middle part, were isolated most frequently (65 (. 9%), thus the pathogen with greater insulation spp., with a distribution of 16%, while Vibrio was Salmonella cholera of 8%. Similarly, the statistical analyses through Duncan's test indicate that there are differences between the levels of the River, being the level under which registered higher occurrence of coliforms and Thermo-tolerant; While the occurrence of Streptococcus was greater in the upper. The pH and temperature were kept constant for both seasons. It is concluded that the growth of indicator bacteria in the basin of the Rio La Villa is highly significant for two times, with differences between sampling points and middle in the case of pathogens such as Salmonella spp.

Key words: Coliforms, coliforms thermotolerant, anaerobic bacteria, Streptococcus, Salmonella spp. Vibrio spp., physical parameters, chemical, dry season, rainy season.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático global es realmente la causa de serios impactos en las poblaciones humanas y los organismos vivientes, trayendo como consecuencia, la reducción dramática de disponibilidad de agua, el aumento de las enfermedades y brotes epidemiológicos, debido al cambio en los biotopos acuáticos (AIDA, 2011).

Se predice que el cambio climático global inducido por el hombre y causado por gases de invernadero provocarán aumentos en la temperatura y precipitación, (Kart *et al.*, 1995). De allí, que existe la posibilidad que también ocurra paralelamente, un aumento en los patógenos microbianos específicos transmitidos por el agua, que prefieren estas temperaturas más cálidas.

Es por ello que las amenazas principales en la diversidad de la cuenca del río La Villa, se originan en los cambios de uso de la tierra, mediante la tala, la quema, la potrerización y la intensa degradación con pérdida de cobertura boscosa del suelo. La posible contaminación de acuíferos y cauces de agua por el aumento desmedido de vertimiento de materia orgánica sin tratamiento, con el aumento subsecuente de la demanda biológica de oxígeno, aumentando la polución biológica, trayendo como consecuencia la pérdida de biodiversidad

Es así, que los resultados durante seis años de monitoreo por ANAM y los estudios realizados en el río La Villa (ANAM, 2002) y el Santa María (CATIE PRODESO, 2006), confirman que los ríos de las cuencas prioritarias en Azuero presentan contaminación principalmente por la alta carga orgánica y que, por su importancia en el desarrollo de las provincias de Herrera y Los Santos, están sometidos a presiones antrópicas que tienden a incrementarse (Arcia *et al.*, 2004).

La importancia radica fundamentalmente en que el río La Villa es utilizado primordialmente para el consumo humano y doméstico, un volumen de agua es usada por el Instituto de Acueductos y Alcantarillados (IDAAN); al igual que es principal fuente para el riego de cultivos agrícolas y pastos para cría de ganado vacuno, y la crianza avícola; además se usa para la recreación. Existen tres puntos importantes: el balneario Los Olivos, El Taguara en Macaracas y el de La Arena en Chitré, asimismo que las personas también se bañan en cualquier parte del río. Esta agua es usada para actividades comerciales e industriales, como la fábrica Nestlé, alcoholes y azúcar en

Pesé. Pero así como se sustrae el agua, también se usa como receptora de descarga de actividades humanas (González, 2003).

En esta investigación se presenta un estudio realizado en la Cuenca del Río La Villa, la cual es una de las Cuencas más importantes de la República de Panamá, especialmente para las provincias de Herrera y Los Santos, ya que es utilizada como fuente de agua potable para algunos lugares de estas dos provincias. Estudios realizados anteriormente en esta cuenca demostraron que la calidad del agua de toda la cuenca es buena; mientras que al comparar los puntos de muestreos, demostraron que la parte alta contiene una calidad muy buena; la parte media una calidad buena con tendencia a disminuir y la parte baja una calidad de regular a mala. (Arden & Price y ANAM, 2002).

El proyecto de investigación, fue desarrollado, en unos 12 meses, la recopilación de datos de las evaluaciones de los indicadores microbianos y patógenos, así como una fase de evaluación de parámetros físico químicos, relacionados al impacto que ha tenido el cambio climático sobre ellos, mediante las variables de temperatura.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del cambio climático sobre la composición, diversidad, incidencia y distribución de, indicadores microbianos, patógenos y factores físicos químicos en sitios de importancia para consumo y uso agrícola de la cuenca del Río La Villa.

Capítulo I

Revisión de la Literatura

1.1. Antecedentes

El mayor efecto que puede tener el impacto del cambio climático, es sobre la ocurrencia de los indicadores biológicos, y el deterioro de la calidad de agua de las fuentes superficiales, que trae como consecuencia la transmisión de enfermedades diarreicas (OMS, 2000). Las fluctuaciones climáticas de alguna manera tienen un efecto sobre la disponibilidad y calidad de agua. De esta misma manera, los aumentos de la temperatura media anual y disminución de la precipitación, que se prevén para futuros años, tendrá impactos significativos en la agricultura (Bouroncle *et al*, 2014).

Bacterias patógenas como *E. coli spp.*, *Vibrio spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.* y *Enterococos spp.*, fueron aisladas a lo largo del cauce del río Surco, Lima, Perú por Osoreo (*et al*, 2009), la exposición a elevadas concentraciones de bacterias en aguas recreativas, en el Sur de California se ha asociado al incremento de contraer infecciones como la gastroenteritis (Semenza *et al.*, 2017). Así mismo en otro estudio De Vicente (1991), estudiando la relación entre *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus fecales*, coliformes totales y fecales en masas de agua en Málaga, España, concluyó que los residuos domésticos son la mayor fuente de *Pseudomona aeruginosa* en las aguas de río y mar provocando contaminación.

Posteriormente estudios en Canadá efectuados por bacteriólogos que tradicionalmente utilizaban estreptococos fecales, coliformes totales y fecales como indicadores bacteriológicos de calidad del agua, comenzaron a determinar otros microorganismos tales como *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* dando como resultado una mejoría en la vigilancia de la calidad microbiana del agua (Pajares, 2001).

La abundancia de aguas en Panamá ha sido clave para establecer un sistema de abastecimiento para las poblaciones, la operación del Canal, la agricultura, la industrialización y la producción energética. El Informe Ambiental de 1999 de la Autoridad Nacional del Ambiente (ANAM) señala que el vertimiento de residuos sólidos, aguas servidas industriales y agro tóxicos al cauce de las quebradas, ríos y

lagos, agrava dramáticamente la disponibilidad del recurso, especialmente en la región litoral del Arco Seco (provincias de Coclé, Herrera y Los Santos) (MINSAs, 2007).

En ese entonces la Autoridad Nacional del Ambiente (ANAM) en conjunto con la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) realizaron un monitoreo que incluyó 35 cuencas hidrográficas de las 52 que hay en el país, el estudio concluyó que en algunos ríos el agua no era apta para ninguna actividad humana (Arcia, 2011).

Estudios sobre la calidad del agua en los principales ríos de Panamá efectuados por la Universidad de Panamá y la Universidad Tecnológica de Panamá, revelan un gran deterioro de los mismos, con elevadas concentraciones de materia orgánica y alta carga bacteriana (ANAM, 2003). Por otra parte análisis físicos, químicos y microbiológicos realizados por el laboratorio del Ministerio de Salud (MINSAs) en la provincia de Los Santos en el 2009 confirmaron la contaminación de origen fecal en el cauce del río Estivaná y como antecedente al nuevo hallazgo, exámenes realizados en los años 2005 y 2006 por esta misma entidad, detectaron la contaminación del río Estivaná por heces fecales provenientes de las lagunas de oxidación de las porquerizas (MINSAs, 2009).

El estudio de la valoración de la diversidad biológica y beneficios ambientales que derivan de la cuenca del Río La Villa, son importante para los procesos de conservación, preservación sostenible de la península de Azuero, así como propicia el manejo adecuadamente sostenible de los ecosistemas que interactúan con la cuenca, sobre todo porque en los últimos años el fenómeno de el niño, ha tenido repercusiones en el río, trayendo los problemas de merma de los caudales y sedimentación con la disminución de las precipitaciones.

Falta por elucidar cuan frecuente los patógenos *V. cholerae* (non-01/non-0139), *Aeromonas* spp., *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y bacteriófagos, están presentes en las aguas superficiales y cuál es el nivel crítico donde estos se convierten en una amenaza a la salud pública.

La importancia de evaluar el impacto del cambio climático sobre la prevalencia de los indicadores microbianos y los organismos patógenos, permitirá, determinar la calidad microbiológica real que nuestras plantas potabilizadora se enfrentan en los procesamientos y eliminación de los mismos, que tiene uso para el consumo humano, así como para las actividades que requieren su uso, como las actividades agrícolas y pecuarias, la cual tiene un reflejo en las actividades de exportaciones de frutas y legumbres la cual el mercado Europeo (normas EUREGAP), así como el mercado Norteamericano, demanda, relacionado con el comercio internacional, demanda de productos de calidad, y en la parte microbiológica son muy exigentes, porque uno de los mayores usos del agua del río La Villa, aparte del uso para agua potable es precisamente para el riego agrícola.

Los resultados durante los seis años de monitoreo de la ANAM y los estudios realizados en el río La Villa (ANAM, 2010) y el Santa María (CATIE, 2006), confirman que los ríos de las cuencas prioritarias en Azuero presentan contaminación principalmente por la alta carga orgánica y que, por su importancia en el desarrollo de las provincias de Herrera y Los Santos, están sometidos a presiones antrópicas que tienden a incrementarse. La cuenca del Río La Villa posee una perturbación antrópica. Debido principalmente a las actividades agropecuarias (ANAM, 2009).

El río La Villa es utilizado primordialmente para el consumo humano y doméstico, un volumen de agua es usada por el Instituto de Acueductos y Alcantarillados (IDAAN) y el sistema de acueducto de Macaracas; principal fuente para el riego de cultivos agrícolas y pastos para cría de ganado vacuno, y la crianza avícola; además se usa para la recreación. Existen tres puntos importantes: el balneario Los Olivos, El Taguara en Macaracas y el de La Arena en Chitré, asimismo que las personas también se bañan en cualquier parte del río. Esta agua es usada para actividades comerciales e industriales, como la fábrica Nestlé, alcoholes y azúcar en Pesé. Pero así como se sustrae el agua, también se usa como receptora de descarga de actividades humanas (CONAMA, 2000).

El departamento de Protección y Ambiente de la Autoridad Nacional del Ambiente (ANAM), expresó que con el paso de los años la contaminación del río La Villa se

incrementa, sobre todo, en la parte baja de la cuenca donde está la mayor cantidad de la población; debido a la descarga de 2.2 millones de galones de aguas negras diarias sin ningún tratamiento. Un estudio realizado por la empresa Arden & Price Consulting, en el año 2002, revela que las aguas negras de los distritos de Macaracas, Pesé, La Villa y Chitré no están siendo tratadas y son enviadas directamente al río, otro factor contaminante son los vertederos adyacentes a la cuenca, como son el de Las Minas, La Villa, Macaracas y Chitré. El estudio demuestra que en Macaracas y Pesé, operan grandes proyectos porcicultores que no tienen el sistema de tratamiento adecuado siendo contaminantes para el río Estivaná, afluente importante del río La Villa, y la quebrada Pesé ()).

Se predice que el cambio climático global inducido por el hombre y causado por gases de invernadero provocarán aumentos en la temperatura y precipitación, así como tormentas de grandes intensidades (Kart *et al.*, 1995). El aumento en la precipitación y las escorrentías de agua contaminará las aguas superficiales, aumentará los brotes de enfermedades transmitidas por vía hídrica (Rose *et al.*, 2000). Se espera que la temperatura global promedio aumente a una tasa de 0.2°C a 0.5°C por década (Houghton *et al.*, 1996). Con estos cambios climáticos potenciales, que tienen como resultado temperaturas más cálidas del agua global, existe la posibilidad que también ocurra paralelamente, un aumento en los patógenos microbianos específicos transmitidos por el agua, que prefieren estas temperaturas más cálidas.

1.2. Calidad Microbiológica del Agua

La calidad microbiológica del agua resulta de gran importancia, dado el riesgo asociado con el consumo de agua contaminada por bacterias patógenas, virus, protozoarios y helmintos provenientes de las heces fecales de humanos y animales (OMS, 2004).

A nivel global, el principal problema relacionado con la calidad del agua lo constituye la eutrofización, que es el resultado de un aumento de los niveles de nutrientes (generalmente fósforo y nitrógeno) y afecta sustancialmente a los usos del agua. Las mayores fuentes de nutrientes provienen de la escorrentía agrícola y de las aguas

residuales domésticas (también fuente de contaminación microbiana), de efluentes industriales y emisiones a la atmósfera procedentes de la combustión de combustibles fósiles y de los incendios forestales. Los lagos y los pantanos son especialmente susceptibles a los impactos negativos de la eutrofización debido a su complejo dinamismo, con un periodo de residencia del agua relativamente largo, y al hecho de que concentran los contaminantes procedentes de las cuencas de drenaje agrícolas (Mayer *et al.*, 2009).

La Organización Mundial de la Salud estima que un 24% de las enfermedades que ocurren en el mundo están asociadas a factores ambientales, entre ellos el agua de calidad insegura y precarias condiciones higiénicas (OMS, 2004).

Dado esto, podemos decir que los microorganismos más importantes que se encuentran en el agua son: Bacterias, Virus, Hongos, Protozoos y algunos tipos de Algas. Estos proceden en su mayoría de los desechos humanos y animales, que de alguna manera llegan a contaminar las vertientes de agua, mares y ríos; son transmitidos indirectamente a poblaciones susceptibles a través de las aguas de distribución inadecuadamente tratadas o a través de aguas recreacionales fuertemente impactadas con aguas residuales y desechos fecales de animales domésticos. (Suarez, 2001).

Es por esta razón, que se da la importancia de determinar el tipo de microorganismo presente en el agua y su concentración, materiales indispensables para conocer la calidad de la misma y para la toma de decisiones en relación al tratamiento y conservación de ecosistemas, para así evitar el riesgo de contaminación de las personas y el ambiente. No obstante, existe una gran dificultad para determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental. Dicha determinación muchas veces implica costos elevados, tiempo, y laboratorios que estén verdaderamente especializados para este tipo de análisis. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con determinados grupos indicadores (Campos, 1999).

1.3 Calidad del agua del Río La Villa

Un estudio realizado en la cuenca del río La Villa lo ubica en la categoría de aguas de calidad regular o poco contaminada con tendencia a mala calidad en la parte media y baja; por tal motivo, en los últimos años aumentaron los sitios de muestreo en la cuenca para incluir los ríos Esquiguita, Gato, Estivaná, y Pesé. Los resultados confirman que la calidad de agua en toda la cuenca se encuentra en el rango de poco contaminada (Arden & Price, 2007).

También se han realizado monitoreos en la cuenca entre los ríos Tonosí y La Villa, los ríos Guararé, Mensabé y Purio; se ha demostrado que a través de los años, el índice de calidad de agua haya variado entre aceptable y poco contaminada, con una tendencia a disminuir la mala calidad (ANAM, 2007).

La cuenca del Río La Villa y la región entre las cuencas de los ríos Tonosí están dentro de las diez cuencas prioritarias a nivel nacional, debido a la condición delicada en que se encuentran sus cursos de agua y a la importancia que tienen para el desarrollo de las provincias de Herrera y Los Santos. Ambas provincias requieren de disponibilidad en cantidad de agua, para aprovechar su potencial de desarrollo socioeconómico. (ANAM, 2002, CATIE, 2006).

1.4 Contaminantes de la Cuenca del Río La Villa

La contaminación de este río se incrementa, sobre todo en la parte baja de la cuenca donde está la mayor cantidad de población. Hay una descarga de 2.2 millones de galones de aguas negras diarias, de vertederos, porcinas y sistemas industriales, que van al río sin ningún tratamiento, procedente de las ciudades de Chitré, La Villa, Macaracas y Pesé,(ver en anexo fig.No.45), (Arden & Price, 2002).

1.5 Indicadores de calidad del agua

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Una vez se ha demostrado la presencia de

grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador (Campos, 1999).

Para que un microorganismo sea indicador de contaminación fecal debe reunir las siguientes características (Fernández et al., 2001):

- Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotermos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotermos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas, su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal.
- Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
- No debe ser patógeno.

1.6 Bacterias Indicadoras

Dado que la enumeración de bacterias o grupos de bacterias indicadoras de contaminación fecal es utilizada para valorar la calidad sanitaria de alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación; no existe un indicador universal, por lo que los especialistas deben seleccionar el apropiado para la situación específica en estudio. Dentro del rango de los indicadores, se encuentra el grupo de bacterias coliformes, *E. coli*, *Bifidobacterium sp.*, *Clostridium perfringens* y el grupo Estreptococos fecales, de ahí que su presencia en el ambiente indique contaminación de origen fecal y el riesgo de aparición de gérmenes patógenos. (Murria, 1990).

1.6.1 Coliformes totales: perteneciente a la Familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos, no esporulados, anaerobios y aeróbicos facultativos que fermentan la lactosa con producción de gas cuando se incuban a 35°C durante 48 horas (Brock, 2004). Se pueden encontrar normalmente en el intestino de animales de sangre

caliente y están casi siempre en el material fecal. Las coliformes presentes en el ambiente (suelo, vegetación) no pueden producir gas a partir de la lactosa bajo las anteriores condiciones (Gómez y Acevedo, 2001). Los mismos son indicadores de contaminación fecal en el agua.

Los coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos. En general, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. Por su amplia diversidad, los coliformes ha sido divididos en dos grupos: coliformes totales y coliformes fecales. El grupo coliformes está formado por los siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* (Rheinheimer, 1987). Este grupo incluye *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Para analizar la presencia de coliformes totales y coliformes fecales existen diversas pruebas, entre éstas tenemos: prueba Colilert, prueba de presencia-ausencia (P-A), Filtración por membrana (La cual consiste en la filtración de un volumen determinado con el objetivo de obtener un crecimiento de bacterias que se puedan identificar con facilidad), (APHA, 1995).

Tradicionalmente, se les ha considerado como indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano; en razón de que, en los medios acuáticos, los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Por lo tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura (Shekwolo y Brisbe, 1999).

Así mismo, su número en el agua es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan del agua, mayor es la gravedad de la descarga de heces.

1.6.2 Coliformes fecales (termotolerantes): representan la fracción de coliformes, en general, de intestinos y materias fecales de hombre y animales de sangre caliente (coliformes termotolerantes).

1.6.2.1 *Escherichia coli*: son organismos mesófilos pertenecientes a la *Familia Enterobacteriaceae*, todas son bacilos gram negativos, glucosa positiva, lactosa positiva inmóvil, aerobios, anaerobios facultativos. Su temperatura óptima en un medio complejo es de 44.5°C, y la mínima de 8°C, y la máxima de 48°C (Brock, 2004). *E. coli* es casi exclusivamente de origen fecal y su presencia es una confirmación efectiva de contaminación fecal (Klein, et al., 2004.).

Los indicadores más utilizados para evaluar la contaminación fecal de los cuerpos de agua son; *E. coli* y el grupo de las bacterias coliformes, (Organización Mundial de la Salud (OMS), 1970).

1.6.3 Estreptococos fecales: Los estreptococos son organismos anaerobios facultativos y Gram Positivos que a menudo aparecen formando cadenas o por pares y son catalasa-negativa (los Estafilococos son catalasa positivos). Los estreptococos se subdividen en grupos, mediante anticuerpos que reconocen a los antígenos de superficie. Estos grupos incluyen una o más especies. Las agrupaciones de estreptococos más importantes son A, B, y D. Entre los grupos de estreptococos, la enfermedad contagiosa (específicamente faringitis) es causada por el grupo A, el cual se enfatiza aquí *Streptococcus pneumoniae* (es la causa principal de pulmonía humana), *Streptococcus mutans* y otros estreptococos llamados viridans (entre las causas de caries dental) no pertenecen a grupos antigénicos. (Geldreich, 1996).

Especies de Estreptococos grupo D de Lancefield (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus equinus*, *S. bovis*) y algunas subespecies y una especie del grupo Q (*Streptococcus avium*). El grupo Enterococos estaría incluido dentro de estreptococos fecales y comprende las especies *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* y sus subespecies (origen humano) y también se usa como indicador de contaminación fecal en agua. (Gray, 1996).

1.6.3.1 Hábitat normal de los Estreptococos

El hábitat normal de los estreptococos fecales es el intestino del hombre y los animales de sangre caliente, por lo tanto, son indicadores de contaminación fecal, sobre todo en muestras de lagos, estuarios, ríos, etc. La identificación de las especies

puede proporcionar información sobre la fuente de contaminación debido a que algunas especies son específicas de sus huéspedes; por ejemplo, una predominancia de *S. bovis* o *S. equinum* indicaría una contaminación por heces no humanas. La información de los estreptococos fecales es útil si se acompaña del índice de coliformes fecales. Los estreptococos fecales han sido utilizados por las autoridades sanitarias de diferentes países para evaluar la calidad sanitaria de sus recursos naturales. En el pasado, el principal papel de este grupo de microorganismos fue la utilización de la proporción coliformes fecal/estreptococo fecal como un indicador de la naturaleza de la fuente fecal; sin embargo, factores como: las diferencias de los rangos de muerte en el ambiente entre estos dos indicadores, la supervivencia variable de los grupos de especies de estreptococos fecales y los métodos para la determinación de estos últimos; hizo que su empleo fuera cuestionable. (Jay, 1992; Gray, 1996).

1.6.3.2 Valor de los Estreptococos

Hay diversidad de opiniones en cuanto al valor de los estreptococos fecales como indicador de contaminación fecal. En investigaciones realizadas en países tropicales se plantea que estas bacterias pueden estar presentes de forma natural en las corrientes; y no reflejan necesariamente el grado de contaminación de dichas aguas, por lo que se considera la hipótesis de que la fuente de la alta concentración de bacterias indicadoras en las corrientes es el suelo. (Patterson, 1996).

Por otra parte, los riesgos asociados con las actividades en aguas naturales destinadas a la recreación; en los que se incluyen enfermedades del tracto respiratorio superior, enfermedades gastrointestinales, infecciones del oído e infecciones de la piel han ocasionado que algunos investigadores de Canadá recomienden como el indicador más apropiado en aguas marinas el grupo enterococos; porque sobreviven en ellas más que los coliformes fecales. También son elegidos cuando hay un tiempo o distancia considerable entre la fuente de contaminación fecal y el área de baño. Además, existe una correlación positiva entre la enfermedad gastrointestinal y los niveles de Enterococos en aguas marinas, aunque la ausencia de ellos no indique carencia de riesgo. (Patterson, 1990).

1.6.4 Los Microorganismos Anaerobios

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo asociado a los *Clostridium spp* y como tal formadores se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas; que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Clostridium perfringens*_(OMS, 1995) que, de acuerdo a un estudio realizado en los sistemas hidrológicos de Estados Unidos, fue detectado en un 73% de las muestras, demostrando así su presencia en las aguas naturales al igual que los coliformes. Son deteriorantes, ya que producen malos olores y, con mucha frecuencia, ennegrecimiento del producto cuando éste tiene hierro, formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro. Estos microorganismos tienen la capacidad de reducir los sulfitos a sulfuros a partir de aminoácidos y compuestos azufrados; y para su detección se utiliza la evidente coloración negra dada por la formación del precipitado (Mac Faddin, 1980; Franczy *et al*, 2000).

La ventaja más importante es que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliformes y son resistentes a la desinfección (Payment y Franco, 1993).

1.7 Relación entre patógenos e indicadores

La contaminación fecal del agua puede incorporar una variedad de diversos organismos patógenos intestinales bacterianos cuya presencia está relacionada con enfermedades. Las bacterias patógenas intestinales se hayan diseminadas a lo largo y ancho del planeta, aquellas cuya presencia ha sido detectada en agua contaminada incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *E. coli enterotoxigénica*, los cuales pueden ser causantes de enfermedades. La presencia de dichos microorganismos indica la existencia de contaminación fecal y la búsqueda de dichos indicadores de contaminación fecal proporciona de esa forma un medio de controlar la calidad del agua. (OPS, 1987).

1.8 Patógenos en agua

Las bacterias patógenas de transmisión hídrica provienen de seres humanos y de animales de sangre caliente. Estos agentes microbianos llegan a los cursos de agua a través de las descargas de aguas residuales sin tratar o con tratamiento deficiente, drenaje de lluvias, escorrentías que pasan por los corrales de ganado. En las zonas rurales la práctica de la defecación a campo abierto también constituye una fuente de contaminación de las aguas superficiales. Se ha demostrado la presencia de bacterias patógenas en aguas superficiales. La presencia de algunas representa un serio riesgo y su eliminación del agua de consumo humano es de alta prioridad debido a que su ingestión podría ocasionar una epidemia con consecuencias graves para la salud de la población. Otras se presentan en forma natural en las aguas y normalmente no son patógenas, pero pueden causar enfermedades en personas con ciertas deficiencias orgánicas que facilitan la infección. Estos microorganismos se denominan bacterias patógenas oportunistas.

Estas bacterias se transmiten por vía oral. La mayoría tiene un tiempo de persistencia en el agua que va de corto a moderado, baja resistencia al cloro y una dosis infectiva alta. Se ha demostrado que en algunas bacterias como la *Salmonella*, el reservorio animal cumple un papel importante. También se sabe que la mayoría de bacterias patógenas no se multiplican en el ambiente, pero algunas, como el *Vibrio cholerae*, pueden multiplicarse en aguas naturales (Aurazo, 2010).

1.8.1 Género *Salmonella* spp.

Salmonella spp., es la enterobacteria de mayor importancia a nivel de salud pública por producir trastornos del tracto gastrointestinal y septicemia no solo en el ser humano, sino en todas las especies animales. (Selbitz *et al* 1995; Turnbull, 1979; Lujan y Blas, 2007).

Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades. Todas las salmonelas son potencialmente patógenas (Smith, *et al*: 1952; Mahajan, *et al*: 2003; Stanchi, 2007), al

ser parásitos intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea (Stanchi, 2007).

Esta bacteria causa la fiebre tifoidea la cual es una enfermedad potencialmente mortal, es todavía común en regiones como Asia, África y América Latina, donde afecta aproximadamente a 21,5 millones de personas cada año.

1.8.1.1 Enfermedades producidas por el género *Salmonella spp*

1.8.1.1.1 Salmonelosis

Constituye un grupo de infecciones producidas por microorganismos del género *Salmonella spp.*, adquiridas por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas y caracterizadas por presentar síndromes febriles asociados a manifestaciones gastrointestinales sistemáticas, con frecuencia severas. Las manifestaciones clínicas de las salmonelosis en humanos y animales se presentan básicamente bajo tres modalidades las denominadas fiebres entéricas, entre las cuales la más común es la fiebre tifoidea producida por la *Salmonella typhi*, las gastroenteritis producidas por varias sub-especies y la forma septicémica, caracterizada por la bacteriemia asociada a lesiones focales. Dentro de las manifestaciones clínicas comunes está la fiebre acompañada de dolor, abdominal, evacuaciones intestinales líquidas frecuentes, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre (Saravia, 2008).

1.8.2. Género *Vibrio spp*

Las bacterias *Vibrio spp* son Gram negativas, facultativamente anaeróbicas, motiles, en forma de bastón curvilíneo, con un único flagelo polar. El género comprende al menos doce especies patógenas para los seres humanos. Algunas especies se asocian principalmente con enfermedades gastrointestinales (*Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*), mientras que otras pueden causar enfermedades no intestinales, como la septicemia (*V. vulnificus*). En las regiones de clima tropical y templado, las especies de *Vibrio* que causan enfermedades están presentes naturalmente en el medio

marino, costero y estuario (salobre), y son muy abundantes en los estuarios. Los vibrios patógenos, en particular *V. cholerae*, también pueden recuperarse de las cuencas de agua dulce de los estuarios (Desmarchelier, 2003), donde además pueden introducirse por contaminación fecal. La presencia de estas bacterias no suele guardar relación con el número de coliformes fecales, no obstante, es posible encontrar una correlación positiva entre la contaminación fecal y los niveles de *V. cholerae* en zonas donde se dan brotes de cólera. También se ha demostrado en varias partes del mundo que existe una correlación positiva entre la temperatura del agua y el número de vibrios. (Dalsgaard *et al.*, 2006).

1.8.2.1. *Vibrio cholerae*

Es el agente etiológico del cólera, es una bacteria enteropatógena transmitida directamente por aguas contaminadas, o indirectamente, cuando éstas contaminan alimentos que se consumen sin cocción. En los países en desarrollo los brotes más severos se han atribuido a la contaminación fecal de las aguas destinadas al consumo, debido principalmente a la inadecuada provisión de agua potable y el pobre saneamiento ambiental. En la prevalencia del cólera en Latinoamérica también ha influido predominantemente la manipulación poco higiénica de los alimentos consumidos por la población, en su mayoría perteneciente a bajos estratos culturales y socioeconómicos; así por ejemplo, en las epidemias que tuvieron lugar en Guatemala, Perú, Ecuador, El Salvador y Bolivia, la enfermedad se asoció principalmente con alimentos y bebidas comercializadas por vendedores ambulantes. (Tauxe *et al.*, 2004). En la actualidad, *V. cholerae* es una bacteria que está bien caracterizada bioquímicamente, y se clasifica en serogrupos en función de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) (Bauman, *et al.*: 2000). De los cerca de 200 serogrupos identificados hasta el momento, solamente dos de ellos, O1 Y O139, se reconocen como los únicos responsables de las epidemias de cólera. A su vez, el grupo de cepas del serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos: *Clásico* y *El Tor*, y en cada uno de ellos se distinguen tres serotipos distintos: Inaba, Ogawa e Hikojima. El resto de serogrupos se les denomina comúnmente como no-O1/no-O139. Suelen aislarse de fuentes ambientales y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones extraintestinales. Aunque, de forma ocasional, se pueden encontrar

cepas no-O1/no-O139 que produzcan la toxina colérica u otros factores de virulencia, pero sin causar ningún brote epidémico (Kaper, *et al*: 2002).

1.8.2.1.1 Enfermedades producidas por el género *Vibrio* spp

1.8.2.1.1.1. Cólera

El cólera es una infección intestinal aguda, grave, que se caracteriza por la aparición de evacuaciones diarreicas abundantes, con vómito y deshidratación que puede llevar al paciente a acidosis y colapso circulatorio en el término de 24 horas y en los casos no tratados puede ocasionar la muerte.

El cólera es causado por un agente infeccioso; se trata de un bacilo aerobio, Gram negativo, con un sólo flagelo polar que le da gran movilidad llamado *V. cholerae*.

El vibrión del cólera sobrevive por periodos hasta de 7 días fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos y templados; en el agua sobrevive unas cuantas horas y algunas semanas si ésta se encuentra contaminada con material orgánico.

Las causas del cólera son diversas, como la contaminación de moluscos con aguas servidas, la contaminación plena de los productos agrícolas a causa de aguas residuales; la contaminación de alimentos en la preparación de la comida; la ausencia de una desinfección, como lo vendría a ser el simple lavado de manos. (Espinoza *et al.*, 2008).

1.9. Técnica de detección e identificación de indicadores y patógenos

Debido a que las bacterias del grupo coliformes están presentes en grandes cantidades en los excrementos y pueden detectarse en concentraciones de hasta 1 por 100 ml, constituyen un indicador de una gran sensibilidad para comprobar la contaminación fecal.

Se dispone de la técnica de la membrana filtrante, donde volúmenes determinados de agua pasan a través de un filtro de membrana que retiene la bacteria en su superficie.

En tanto que para analizar muestras de agua con posibles organismos patógenos se deberá incluir todas las etapas siguientes: concentración de los microorganismos en las muestras, inoculación en un caldo de abono, sub-cultivos en medios de agar

selectivos, y análisis bioquímicos y serológicos de las colonias sospechosas (OMS, 1987).

1.10. Técnica de filtro de membrana

La técnica de filtración por membrana utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro (0,45 μm); esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los microorganismos de tamaño menor que el específico del poro pasan la membrana o quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego esta es llevada a un medio enriquecido, selectivo o diferencial, quien a través de intercambio metabólico y una incubación, evidencia el crecimiento de microorganismos y Unidades Formadoras de Colonias.

Esta técnica es altamente reproducible y proporciona resultados numéricos, es una manera rápida y simple de estimar las poblaciones bacterianas en el agua, y especialmente útil al evaluar grandes volúmenes o al realizar diariamente muchas pruebas de Coliformes.

1.11 Técnica para concentración y evaluación de patógenos en agua

La detección de varios patógenos entéricos es necesaria para la salud y seguridad pública, ya que basta un solo organismo infeccioso para causar enfermedad en los seres humanos. Los métodos típicos de detección microbiana para evaluar las fuentes de agua comienzan con un paso de filtración o concentración dirigido hacia aislar concentraciones pequeñas de patógenos, es decir, de una a 10 unidades infecciosas, de grandes volúmenes de agua. (Reynolds, 2004).

Si bien la búsqueda directa de bacterias patógenas específicas no forma parte de los exámenes bacteriológicos habituales a los que se someten las muestras de agua, habrá casos en que será necesario efectuar exámenes para la determinación de gérmenes patógenos intestinales. Las posibilidades de obtener buenos resultados serán entonces mayores si se analizan volúmenes grandes de agua y si se usan medios selectivos para

determinados gérmenes patógenos intestinales. Si bien los análisis incluirán todas las etapas siguientes: concentración de los microorganismos en la muestra, inoculación en caldo de abono, subcultivos en medios de agar selectivos, análisis bioquímicos y serológicos de las colonias sospechosas. (OPS, 1987).

1.11.1 Enriquecimiento en medio selectivo para *Salmonella spp*

Se realiza en caldos de enriquecimiento, los cuales estimulan el crecimiento de formas compatibles con *Salmonella sp*, e inhiben el desarrollo de bacterias intestinales y coliformes.

Caldo Rappaport – Vassiliadis es un medio de enriquecimiento selectivo de *Salmonella sp* en alimentos y otros ambientes. Mediante la utilización de este caldo, es posible obtener algunas ventajas sobre otros medios nutritivos de enriquecimiento, obteniéndose un rendimiento de alrededor del 100%, especialmente a una temperatura de 43°C y previo enriquecimiento (Van Schothorst, *et al*: 2004). El medio cuenta con una baja concentración de verde de malaquita, cloruro de magnesio, y harina de soya para así obtener un mayor porcentaje de recuperación de *Salmonella sp*. Además la reducción del pH a 5,2 mejora la selectividad (Trichopoulos, 1972; Iveson, 2004).

1.11.2. Enriquecimiento en medio selectivo para *Vibrio spp*

Vibrio spp crece muy rápidamente en agua peptonada alcalina, y al cabo de 6 a 8 horas está presente en mayor cantidad que otros microorganismos. El enriquecimiento en dicho medio favorece el aislamiento de *Vibrio cholerae* cuando hay pocos microorganismos, como en muestras de personas convalecientes y de portadores asintomáticos.

Se han descritos otros caldos de enriquecimiento para el cultivo de *Vibrio cholerae*. Entre ellos se puede mencionar el medio de enriquecimiento de Monsur, que contiene tripticasa, telurito de potasio. (Farfán, 2002).

1.11.3 Aislamiento en Medios Selectivos, Agar XLD y *Salmonella-Shigella* para *Salmonella spp*

1.11.3.1 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

Medio para el aislamiento y diferenciación de enterobacteriáceas patógenas, especialmente especies de *Shigella sp* y *Salmonella sp*. El efecto inhibitorio de este medio de cultivo es débil; el desoxicolato genera la inhibición de bacterias coliformes y permite la dispersión de cepas de *Proteus sp* que pueden llegar a confundirse con las colonias producidas por *Salmonella*; adicionalmente, la diferenciación entre *Salmonella sp* y *Shigella sp* se da porque la primera produce fermentación de la Xilosa, descarboxilación de Lisina y genera ácido sulfhídrico (Hurtado, 2001).

1.11.3.2 Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) para *Vibrio spp*

Este medio es altamente selectivo para las especies de *Vibrio sp* debido a sus componentes nutricionales y a la alta concentración de sales, este medio junto en el agua peptonada alcalina es utilizado para el aislamiento de *Vibrio cholerae*, no requiere esterilización en autoclave, es diferencial y selectivo.

1.12. Aislamiento e Identificación Bacteriana

La identificación de un microorganismo es el mecanismo que se sigue para determinar su especie, hasta donde es posible interpretar sus características por observaciones y ensayos adecuados, y los datos acumulados se comparan con descripciones publicadas de varias especies. El microorganismo se identifica adecuadamente, cuando la descripción de una especie es idéntica con las características observadas. (Carpenter, 1979, citado en Castillo y Quintero, 2010).

1.13 Parámetros Físicos Químicos del Agua

La calidad del agua modificada por sustancias puede ser no tóxica, de allí que los aspectos físicos químicos sean importante, entre ellos se evaluó en esta investigación: la turbidez, pH y temperatura, conductividad, alcalinidad y oxígeno disuelto.

1.13.1 Turbiedad

La turbiedad es una medida de la cantidad de materia en suspensión que interfiera con el paso de un haz de luz a través del agua. Se expresa en unidades de nefelométricas de turbiedad (UNT) y se mide con un turbidímetro (OMS, 1998). Es producida por materias suspendidas como arcilla o materia orgánica e inorgánicas finalmente divididas, compuestos orgánicos solubles coloreados, plancton y otros microorganismos (APHA et al., 1995).

1.13.2 Temperatura

Es uno de los parámetros físicos más importantes en el agua, pues por lo general influye en el retardo o aceleración de la actividad biológica, la absorción de oxígeno, la precipitación de compuestos, la formación de depósitos, la desinfección y los procesos de mezcla, floculación, sedimentación y filtración. Múltiples factores principalmente ambientales, pueden hacer que la temperatura del agua varíe continuamente (Barrenechea, 2011).

1.13.3 pH

El pH es el contenido de ion hidrógeno en medio acuoso. Las aguas que poseen un valor de pH superior a 7 son alcalinos y si es inferior son acidas. El agua de los ríos que no está afectada por la contaminación presenta un pH entre 6.5 y 8.5, dentro del cual los organismos acuáticos capturan y liberan dióxido de carbono durante la fotosíntesis y respiración, respectivamente (Hem, 1985).

1.13.4. La Conductividad

El agua en condiciones naturales tiene iones en disolución y su conductividad es proporcional a las características y cantidad de los mismos. Es por ello que se utilizan

los valores de conductividad como índice aproximado de concentración de solutos, es un parámetro que se mide en el terreno.

1.13.5. El Oxígeno Disuelto

Este parámetro alcanza un nivel elevado en aguas superficiales limpias. Sus bajas concentraciones suelen indicar la presencia de materia orgánica que deteriora la calidad del agua, amenaza la mantención de determinadas formas de vida acuáticas.

Se mide en el terreno, temperaturas elevadas interfieren con la validez de la medición.

Es uno de los análisis fundamentales de la calidad de agua. En un curso de agua de buena calidad la cantidad de oxígeno disuelto es superior a 4 partes por millón; cuando el resultado del análisis da un valor inferior, indica serios problemas de la calidad del agua.

1.13.6. Alcalinidad

Es una característica que tiene que ver directamente con la presencia de sales de metales alcalino térreos como calcio o magnesio. la dureza puede ser alta o ligeramente alta, los principales inconvenientes de la dureza es la resistencia a la formación de espuma, provoca incrustaciones en las tuberías, para agua potable un agua de calidad satisfactoria, debe tener menos de 100 mg/l, por arriba de los 300 mg/l, no es apropiada para uso potable.

1.14. Normas y legislación internacional para aguas superficiales de ríos

La OMS ha establecido criterios internacionales para la concentración de coliformes totales y fecales admisibles en aguas superficiales, en colaboración de sus estados miembros y de igual forma los organismos internacionales (EPA, AWWA, APHA), cuentan con normas y regulaciones de calidad de agua.

La norma establecida de acuerdo a la OMS, para el número de coliformes aceptables es hasta 1000 UFC/100ml, 100UFC de *E.coli* /100ml (Gerba *et al.*, 2000).

En Estados Unidos, existen autoridades encargadas de velar por la calidad del agua así como también en Chile, Brasil y las de la Unión Europea.

Los niveles de coliformes fecales en Estados Unidos son de 200UFC/100ml y Estreptococos 35UFC/100ml, según la Unión Europea, establece que debe haber 500UFC Coliformes Totales /100ml, 100UFC de Coliformes Fecales /100ml, 100UFC Estreptococos Fecales /100ml.

Estos criterios establecidos en las normas sobre calidad de agua mejoran cada día las técnicas para medir la misma en el momento de interpretar los resultados de un análisis como las normas de calidad microbiológicas, normas relativas en cuanto a la concentración de químicos y normas relativas a los productos secundarios de la desinfección (MINSA,1999).

Cuadro N°1: Normas primarias anuales de calidad ambiental para cada uno de los compuestos o elementos en las aguas superficiales

Grupo de Elemento o Compuesto	Unidad	Valor
Indicadores Microbiológicos		
Coliformes Fecales	UFC/100ml	<10
Coliformes Totales	UFC/100ml	<200
Indicadores Físicoquímicos		
Conductividad Eléctrica	mS/cm	<600
DBO ₂	mg/l	<2
Oxígenos Disueltos	mg/l	>7.5
pH	Rango	6.5-8.5
Sólidos Disueltos	mg/l	<400
Sólidos Suspendidos	mg/l	<24
Temperatura	°C	<0.5

Fuente: Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (BSN),2006

1.15. Normas Panameñas para aguas superficiales.

Para asegurar la protección de la salud humana del país y el mejoramiento de la calidad del ambiente, es preciso aplicar las normas de calidad ambiental y los límites

máximos permisibles para el caso de coliformes totales, el nivel permisible de estas bacterias es de 100UFC/100ml en este tipo de agua, tal como se muestra en el cuadro de abajo, establecido en el Decreto ejecutivo No. 75.

Cuadro N°2 : Niveles de la calidad de las aguas para uso recreativo con y sin contacto.

Parámetros	Unidad	Bajo Riesgo	Riesgo Medio
		Contacto directo	Sin contacto directo
Bacteriológicos			
Coliformes fecales	UFC/100ml	=<250 coliformes fecales /100ml o 200 estreptococos fecales/100ml	251- 450 coliformes fecales/100ml o 201-500 estreptococos fecales en 100ml
Físico químicos			
pH	Unidad de pH	6.5-8.5	6.5-8.5
Temperatura	°C	3	3
Solidos flotantes	-	Ausentes	Ausentes
Solidos suspendidos	mg/l	<50	<50
Solidos disueltos	mg/l	<500	<500
Color	Pt-Co	<100	100-150
Turbiedad	NTU	<50	50-100
Oxígeno disuelto	mg/l	>7	6-7
DBO ₂	mg/l	<3	3-5

Fuente: Ministerio de Economía y Finanzas, 2008.

Capítulo II

Aspectos Metodológicos

2.1. Ubicación del estudio

La cuenca del río La Villa se encuentra ubicada en la vertiente del Pacífico, en la Península de Azuero, entre las coordenadas geográficas 7° 30' y 8° 00' de latitud norte y 80° 12' y 80° 50' de longitud oeste. Su forma es alargada y bastante ancha en la parte alta y más angosta a medida que se aproxima al mar.

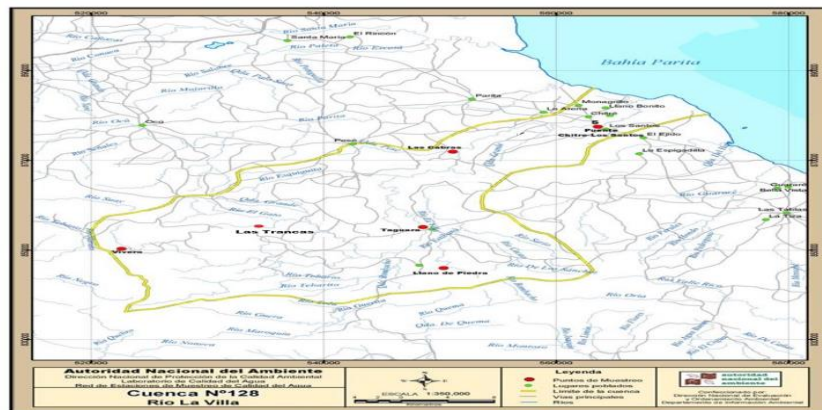
La cuenca del Río La Villa tiene un área de drenaje de 1,284 km² y una elevación media de 170 msnm. El punto más alto de la cuenca es el Cerro Cacarañado con una elevación de 997 msnm. Su río principal, La Villa, tiene una longitud de 117 kilómetros.

Esta cuenca se caracteriza por presentar un alto grado de deterioro ambiental, sobre todo en la cubierta vegetal dentro de la misma. La deforestación es alta debido al mal uso del suelo, siendo la causa principal la ganadería pastoril.

El estudio se realizó en tres puntos: en la parte alta, media y baja, (Figura 1) de la Cuenca del río La Villa. La parte alta está localizada en Tres Puntas (Anexo Fig. No. 41) dentro de la Reserva Forestal El Montuoso, en el distrito de Las Minas, entre los corregimientos de El Toro y Chepo, Provincia de Herrera. El punto medio (figura 2) se localiza en Macaracas, Balneario La Tahuara, Paso Viejo (Chupa), La Corneta, (Anexo fig. No. 42) la cual es un distrito de la Provincia de Los Santos, localizado a los pies del Cerro Canajagua.

El punto bajo está localizado en Los Santos, específicamente en el área de la Represa de Alcoholes Del Istmo S.A, en Las Cabras, Los Olivos y La Represa De La Fabrica La Nestlé (Anexo fig. No. 43 y 44), la cual es un área de diversión para los santeños y otros en el verano. Se incluyeron los puntos de las captaciones (Anexo fig. No. 46) de

las potabilizadoras Roberto Reina y Rufina



Alfaro.

Figura 1: Ubicación de los puntos alto, medio y bajo del monitoreo realizado al Rio La Villa. Fuente Miambiente, 2009



Figura 2: Localización geográfica de los sitios bajo estudio en la investigación parte media y baja de la cuenca del Rio La Villa, en Azuero

2.2 Diseño de la Investigación

Este estudio utilizó un diseño completamente al azar de tipo descriptivo expofacto, con la evaluación de variables biológicas (indicadores y patógenos), físicas y químicas. El muestreo se realizó de manera puntual y simple, realizándose en dos épocas del año: seca y lluviosa, para evaluar la variabilidad estacional en los puntos alto, medio y bajo del río Para este estudio, se eligieron diferentes puntos de muestreo a lo largo de la cuenca del río La Villa.

En cada punto de muestreo se tomó un total de 6 muestras de agua semanalmente en cada época, con sus respectivas replicas, 3 para los indicadores microbiológicos y 3

para los patógenos, dando un total de 36 muestras de agua por semana, totalizando 108 muestras por campaña y 216 entre las 2 épocas. En cada punto de muestreo se evaluó parámetros físicos químicos.

2.3 Variables de la investigación

2.3.1. Nivel de muestreo (alto -medio-bajo)

Se refiere a un sistema que está caracterizado por la integración e interrelación de los componentes bióticos y abióticos manteniendo un equilibrio dinámico y de interacción, una cuenca puede estar claramente dividida de acuerdo a las acciones naturales o antropogénica en parte alta, media y baja, donde la parte alta es aquella donde se conserva y no existe perturbación alguna del hombre a los ecosistemas y bosques, manteniéndose íntegra la biodiversidad, en la parte media, vemos una perturbación y fragilidad de los ecosistema acuáticos y terrestres que sostiene la cuenca hidrográfica, en la parte baja, existe un alta presión antropogénica, ya que es el área donde se concentran las poblaciones (De La Cruz, 2008).

2.3.2. Época seca

El período entre diciembre y abril corresponde a la época seca. En esta época es donde se presenta menor precipitación pluvial (ETESA, 2010).

2.3.3. Época lluviosa

La época de lluvias se inicia en el mes de mayo y dura hasta noviembre, siendo los meses de septiembre y octubre los más lluviosos (ETESA, 2010).

2.3.4. Muestreos

Comprendió los puntos de monitoreo y toma de muestras, por campaña, de agua para la evaluación física y microbiológica.

2.3.5. Parámetros microbiológicos

Se refiere a la presencia de bacterias Coliformes totales y termotolerantes (fecales), Streptococcus fecales, anaerobios, microbiota asociada al río, que pueden afectar la salud del ser humano. Se evaluaron a través de la determinación de estos indicadores de contaminación biológica, y adicionalmente las bacterias patógenas en agua, como

Salmonella spp y *Vibrio spp*; aunque esto no se realiza habitualmente en los análisis bacteriológicos rutinarios (OMS, 1987).

2.4 Metodología usada en la investigación

Se efectuó en dos fases: fase de campo y fase de laboratorio, en **la Fase de Campo** para ambas épocas del año y en cada estación de monitoreo con sus respectivos puntos de muestreos, se procedió a tomar muestras para análisis Microbiológicos, y la realización de análisis físico con un multiparamétrico, y químicos mediante titulación (alcalinidad).

2.4.1 Muestras en campo

Las muestras que se analizaron fueron tomadas específicamente en la cuenca del Río de la Villa; se tomaron en frascos estériles 100ml de agua, utilizando guantes de látex. La toma de la muestra se realizó lo más alejado posible de la orilla del río, sumergiendo el frasco unos 20 cm por debajo de la superficie, sujetado por el fondo en posición invertida y dándole la vuelta en sentido contrario a la corriente, fueron etiquetados con el número de la muestra, punto de muestreo y la fecha de recolección para que no hubiera confusión a la hora de procesar los datos; y luego se procedió a colocarle la tapa y colocarlo en la nevera a 4 ° C para ser llevado al laboratorio de Calidad de Agua del Ministerio de Salud, para su análisis microbiológico, (anexo Fig. No. 48)

Además se tomaron algunos parámetros *In situ* tales como el **pH, temperatura, turbiedad, oxígeno disuelto, conductividad**, usando un Multiparamétrico marca **HANNA, modelo 92132** (anexo fig. No. 41). Para ello se procedió a tomar muestras de 1L en botellas de vidrio o plásticos, para los análisis de alcalinidad y fosfato y nitrato y se refrigeró inmediatamente, metodología sugerida por el Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (**APHA, 1999**).

2.4.2 Técnicas para el procesamiento microbiológico de la muestras.

La técnica utilizada deriva del Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, (APHA, 1999). La cual se basa en la filtración de un volumen determinado, con el objetivo de obtener un crecimiento de bacterias que se pueda identificar con facilidad. El filtro de membrana puede ser de vidrio, plástico autoclavable, porcelana o acero inoxidable, el cual consiste en un embudo transparente sujeto a una base por un dispositivo de bloque o en su lugar por la fuerza magnética o la gravedad; el diseño debe permitir que el filtro de membrana sea colocado de forma segura en la placa porosa del receptáculo y permitir que todo líquido pase a través de la membrana durante la filtración; con el aspirador de mano aspirar el agua ya depositada en el embudo y así sucesivamente, (anexo Figuras No. 47 y 49).

En este caso, se hicieron tres diluciones por cada muestra recolectada (4 muestras), la última dilución (10^{-3}) fue la que se filtró, luego de filtrada se retiró la membrana y posteriormente colocada en el agar correspondiente. Luego fueron incubados a la temperatura indicada para cada agar. En este caso, para los Coliformes Totales fueron incubados por 24 horas a una temperatura de 35 ± 0.5 °C, produciendo unas colonias de color rojo oscuro con un brillo verde metálico; los Coliformes Fecales (termotolerantes), fueron incubados por 24 horas a una temperatura 44.5 ± 0.2 °C, formándose colonias de color azul o azul claro. Los Estreptococos se incubaron por 48 horas a una temperatura de 35 ± 0.5 °C, produciendo colonias de color rojo oscura al rosa, (anexo Figuras. 39 y 40).

2.4.3 Técnicas para Detección de Anaerobios

Para los Anaerobios, además de la técnica de filtro de membrana, se procedió utilizar la técnica de anaerobiosis; la cual consiste en colocar el plato petri con su respectiva membrana en una jarra de vidrio estéril con tapa rosca, y sobre esta se le coloca una vela encendida, además de la cinta de Gasparck; luego se procede a tapan el envase y sellarlo bien para que no le entre oxígeno. El momento en que se apague la vela indica que no hay oxígeno y comienza el proceso de anaerobiosis, hasta que pasen 24 ± 0.2 horas para ver los resultados, en este caso no se pudo observar nada ya que no hubo crecimiento de colonias.

Los resultados fueron expresados en UFC/ μ m para todas las muestras recolectadas, la fórmula utilizada fue:

$$\text{UFC} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias} \times 100}{\text{ml de la muestra filtrada}}$$

2.4.4 Aislamiento y Detección de microorganismos patógenos

Para las muestras de agua con posibles organismos patógenos se utilizó la técnica de filtro de membrana, descrita por el Centro para el Control y La Prevención de Enfermedades (CDC); Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (NCID); Organización Panamericana de La Salud (OPS), 1994, Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de *Vibrio cholerae*, este método también se utilizó para el caso de *Salmonella spp*, dicha técnica consistió en filtrar un volumen de agua entre 100 a 300 ml a través de una membrana colocada en un sistema de filtración, finalizado el proceso de filtración de las muestras se colocaron las membranas en tubos Falcon de plástico con una capacidad de 50 ml, cada uno con 30 ml de agua peptonada, este proceso se conoce como pre-enriquecimiento, y luego se incubaron a una temperatura de 35 a 37°C por 24 horas.

2.4.5. Enriquecimiento selectivo para microorganismos patógenos

Finalizado el proceso de incubación se tomó 0.1 ml de los tubos Falcon iniciales con agua peptonada que presentaban turbidez y se colocó en otros tubos Falcon que contenían 15 ml de caldo Rappaport – Vassiliadis que es específico para *Salmonella spp* y se procedió a incubar a una temperatura de 43°C por 24 horas. Para el caso de *Vibrio spp* se tomó el mismo volumen 0.1 ml del tubo Falcon con agua peptonada con turbidez aparente y se vierte en otro tubo que contiene 15 ml de agua peptonada alcalina y se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas.

2.4.6. Aislamiento selectivo para microorganismos patógenos

Luego del proceso de incubación de los diferentes caldos de enriquecimiento selectivo se procedió a sembrar en agares para el aislamiento selectivo, como los son el agar *Salmonella-Shigella* y agar TCBS.

Se tomó 0.01 ml de los tubos con caldo Rappaport – Vassiliadis y se sembró en un plato petri de 20 ml con agar *Salmonella-Shigella*; se realizó el mismo procedimiento para los tubos con agua peptonada alcalina y luego se sembró en plato petri con agar TCBS, con la ayuda de una asa bacteriológica se esparció por todo el medio mediante el proceso de estriado. Cada tubo con caldo Rappaport – Vassiliadis y agua peptonada alcalina se sembró por triplicado. Luego se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas.

2.4.7 Aislamientos de colonias sospechosas

A las 24 horas se tomaron los platos con agar *Salmonella-Shigella* y agar TCBS para repicar o seleccionar las colonias sospechosas de *Salmonella spp* y *Vibrio spp*.

Las colonias de *Salmonella spp* que se seleccionaron en el medio *Salmonella-Shigella* fueron translúcida u opacas y con centro negro; mientras que las colonias sospechosas de *Vibrio spp* en el medio TCBS fueron grandes, aplanadas, amarillas y con el centro opaco. Una vez verificado su aspecto de crecimiento en los medios selectivos de las colonias sospechosas, se procedió a realizar un cultivo puro; con un asa en punta se picó la colonia sospechosa y sembró, mediante la técnica de estriado se estrió en platos petri con agar tripticasa de soya. Luego se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas (anexo Fig. No. 50)

2.4.8. Identificación bioquímica

Ya con las colonias sospechosas aisladas se procedió a realizar la tinción de Gram a cada una de ellas para confirmar que no haya un cultivo mixto, luego se procedió a sembrar cada cepa pura en tubos con rosca que contenían 10 ml de agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37°C.

Una vez finalizado el proceso de incubación se procedió a realizar una batería de pruebas bioquímicas como Triple Azúcar e Hierro TSI, Agar Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM), citrato, Agar Lisina y hierro (LIA), agar fenilalanina, agar sangre y la prueba de sensibilidad a antibióticos.

2.5. Análisis Estadísticos

Los datos recolectados según el estudio fueron analizados mediante el ANOVA, correlación, análisis de conglomerado y prueba de comparación de medias de Duncan

para el diseño completamente al azar, y se hizo la comparación de los límites unilaterales de F al nivel de 5 % de probabilidad.

Capítulo III

Resultados y Discusión

3.1 Evaluación de Indicadores bacterianos

De acuerdo a los resultados de la evaluación de indicadores microbiológico, los Coliformes Totales a nivel de la cuenca del río La Villa para ambas épocas, arrojaron diferencias altamente significativas con una mayor cuantificación para la época lluviosa, (Cuadro No. 3 y Figuras No. 3 y 4).

Cuadro No. 3. Análisis de varianza: conteo UFC (Unidades formadoras de Colonias) Coliformes Totales en las dos época del año.

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- valor	Pr > F
Modelo	5	42227.29339	8445.45868	91.79	< .0001**
Error	82	7544.94877	92.01157		
Total	87	49772.24216			

Coef. Var: 24.78857%

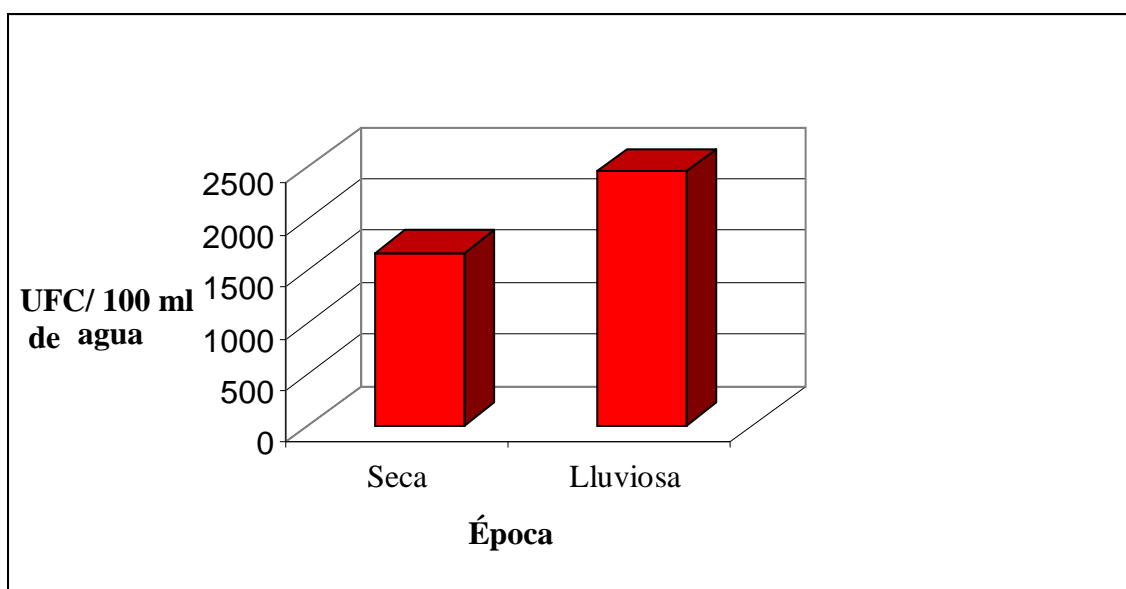


Figura No. 3 Determinación de Bacterias Coliformes totales para ambas épocas durante el estudio.

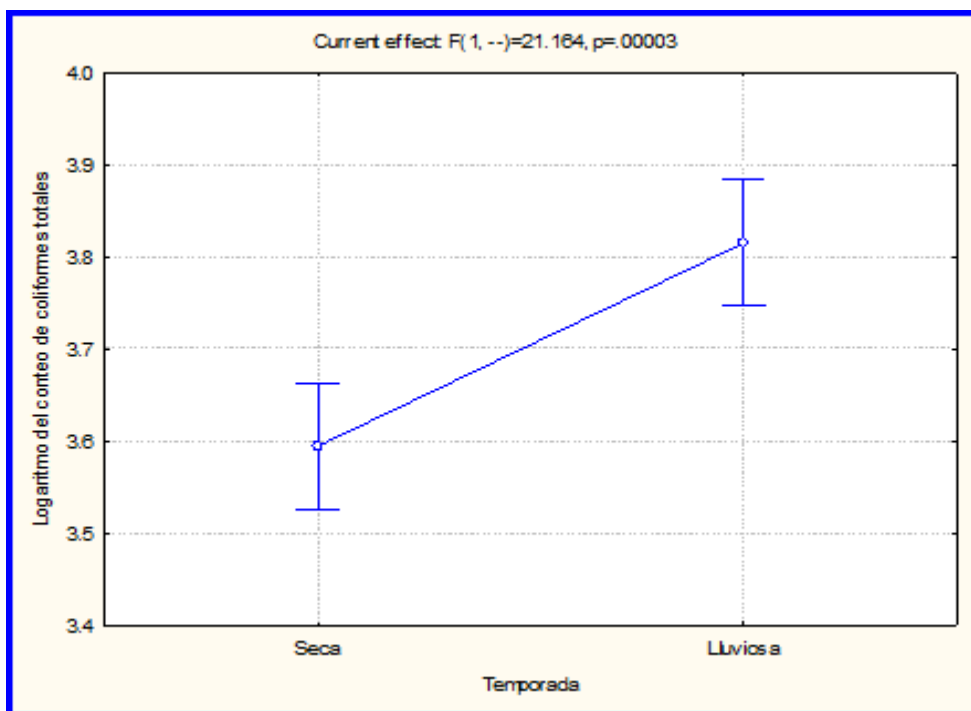


Figura No.4: Diferencias significativa de Coliformes entre la época seca y lluviosa

Se observa mayor distribución de coliformes totales para la época lluviosa, debido al lavado de los suelos, la cuenca del río La Villa, posee perturbación antrópica, debido principalmente a las actividades agropecuarias (Arcia et al., 2004).

En cuanto a los resultados obtenidos para los Coliformes Fecales (termotolerantes) a nivel de la cuenca del río La Villa para ambas épocas, se determinó diferencias altamente significativas, con una mayor concentración de Coliformes Fecales para la época seca, (véase, **figura No. 5 y Cuadro No. 4**).

Cuadro No. 4. Análisis de varianza: conteo de colonias (UFC/100 ml) Coliformes Fecales en las dos épocas del año (seca y lluviosa).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Modelo	5	12496.71101	2499.34220	16.26	< .0001**
Error	82	12603.68152	153.70343		
Total	87	2500.39253			

Coef. Var: 78.33246%

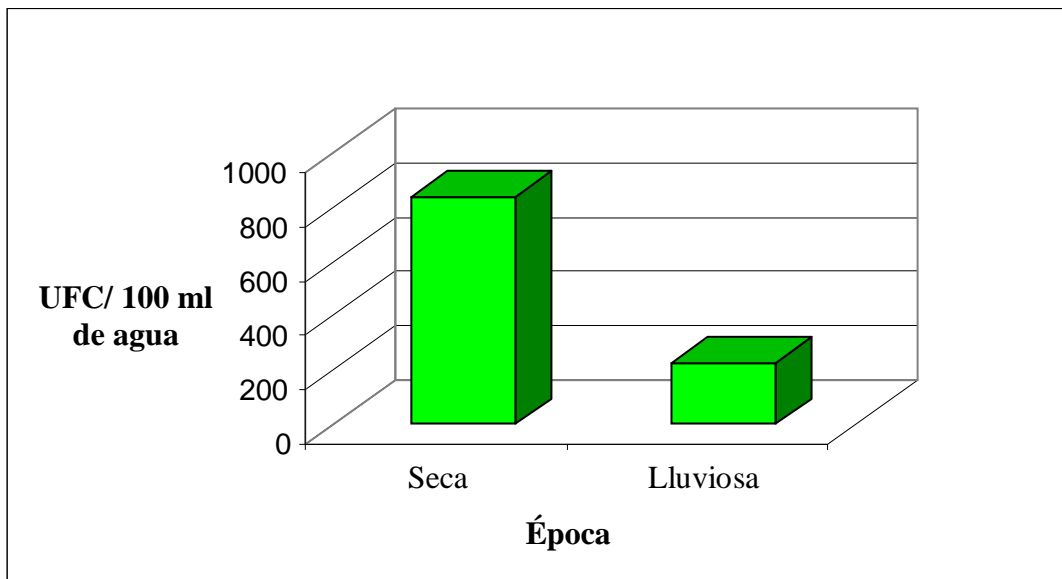


Figura No.5: Determinación de Bacterias coliformes fecales (Termotolerante) para ambas épocas

En la época lluviosa se da el valor más alto de Coliformes mientras que para la época seca se obtienen los promedios más altos de *Coliformes fecales*. Se muestra que no es mucha la diferencia en la incidencia entre las estaciones pero si entre los microorganismos Coliformes y Coliformes fecales.

Los análisis de la calidad microbiológica de la Cuenca del Río La Villa para ambas épocas del año arrojaron que hay diferencias significativas entre ambas, esto lo confirma un estudio realizado por la ANAM, (2007); en la cual llegaron a la misma conclusión para ambas épocas.

Para los Coliformes Totales, se detectó que no hay diferencias significativas entre ambas épocas, con un mayor crecimiento en la época lluviosa, a un 5 % de probabilidad, véase (**Cuadro No. 3 y Figuras No. 3y4**). Para los Coliformes Fecales se obtuvo que si hay diferencias significativas entre ambas épocas así lo demuestra análisis de varianza, que hubo diferencias altamente significativas entre la época seca y lluviosa con probabilidad de 1% (<0.0001), esto lo corrobora en un estudio realizado por el ANAM, (2009), durante los años 2002 a 2008 que en sus resultados sobre la evaluación de UFC de coliformes fecales arrojó que en la parte de Los Olivos para el año 2008 durante la época seca fue de 200 UFC, mientras que para la época lluviosa se obtuvo 22 000 UFC, (**Cuadro No. 4 y Fig. No. 5**). Para los Estreptococos se detectó que hay diferencias significativas entre ambas épocas, con un mayor

crecimiento en la época lluviosa, que en la época seca, (**Cuadro No. 5 y Figura No. 6**).

Cuadro No. 5. Análisis de varianza: conteo de colonias (UFC/100 ml) *Streptococcus* fecales en las dos época del año (seca y lluviosa).

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Modelo	5	294956.2921	58991.2584	296.11	< .0001**
Error	82	16336.1585	199.2214		
Total	87	311292.4506			

Coef. Var: 32.77032%

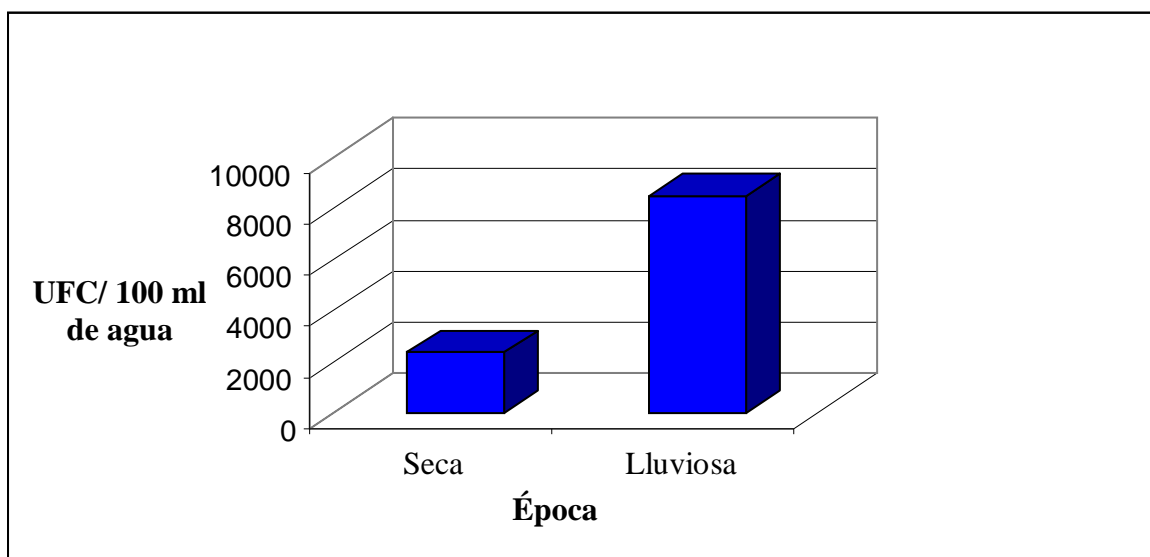


Figura No.6: Determinación de *Streptococcus* fecales para ambas épocas del año.

La ocurrencia de *Streptococcus* sp a lo largo del río La Villa en los sitios de muestreos para la investigación: La Tahuara, Paso Viejo (Chupá), La Corneta (La Colorada), Las Cabras, Los Olivos, Tres Puntas (El Montuoso) y Represa La Nestlé. La mayor ocurrencia de *Streptococcus* spp se presentó en el sitio a la altura de la Represa de la Empresa La Nestlé (**Fig.No.7**), a nivel posterior a la represa La Nestlé, existe un descarga de aguas residuales sin tratamiento, siendo el rio La Villa receptor de descargas de actividades humanas (González, 2003).

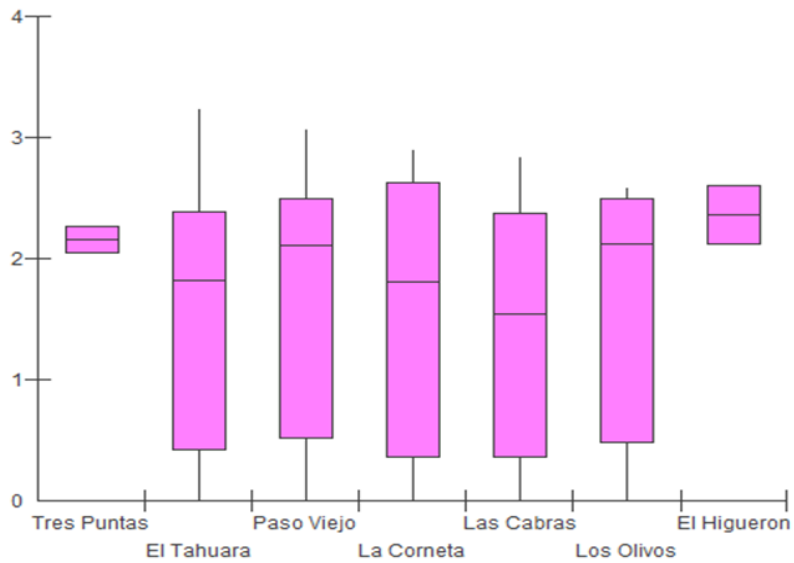


Figura No. 7 Ocurrencia de *Streptococcus* spp., en los diferentes sitios de muestreos a lo largo del río La Villa, desde enero del 2016 a diciembre de 2016.

Con respecto a los resultados para los Anaerobios a nivel de la cuenca del río La Villa para ambas épocas no fue significativo, ya que de estos no fueron detectados para esta investigación (**Fig. No.8**).

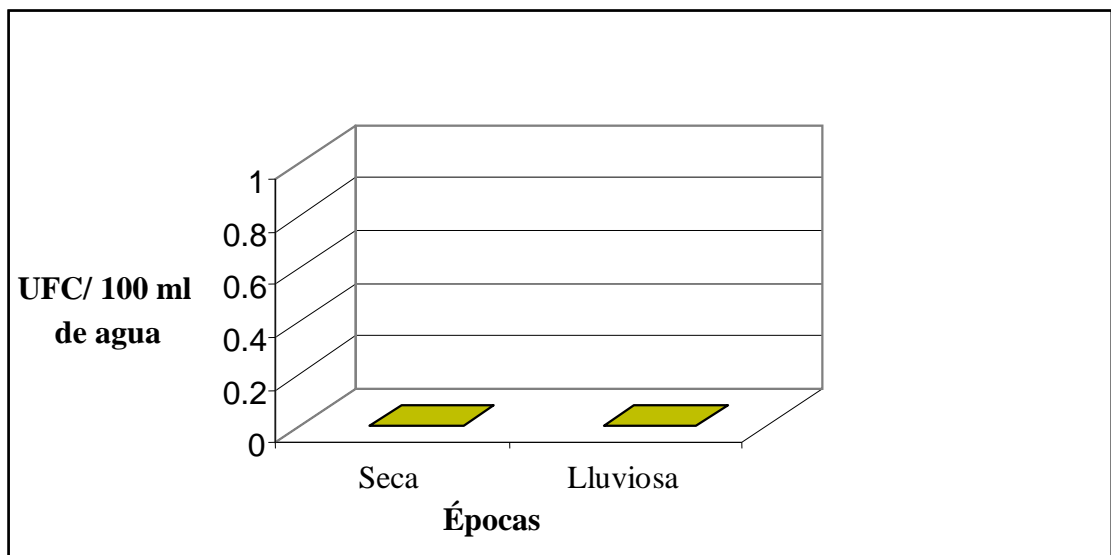


Fig. No. 8: Recuento de Anaerobios para ambas épocas del año.

De acuerdo a los resultados para los indicadores estudiados (Coliformes Totales, Fecales, Estreptococos y Anaerobios), entre los niveles del río en la época seca se puede observar que hay diferencias significativas entre estos, ya que los

Coliformes Totales obtuvieron mayor crecimiento en la parte media y baja del río, (**Figuras No. 9 y 11**). Mientras que los Coliformes Fecales (termotolerantes) se concentraron en la parte baja de la cuenca, (**Figuras No. 11,12 y13**) El número de coliformes totales y coliformes fecales aumenta con el punto de muestreo, siendo más bajo en el punto alto que en el bajo, El número de coliformes fecales fue más bajo en la sección alta, no existiendo diferencias entre las secciones media y baja.

Para los Estreptococos, se observó mayor ocurrencia en la parte alta del río, véase (**Fig. No. 10**). Las actividades pecuarias y humanas que se intensifican en esta parte del río, lo que podrían tener implicancia en estos resultados, los coliformes al igual que los estreptococos están relacionados con cuadros de gastroenteritis.

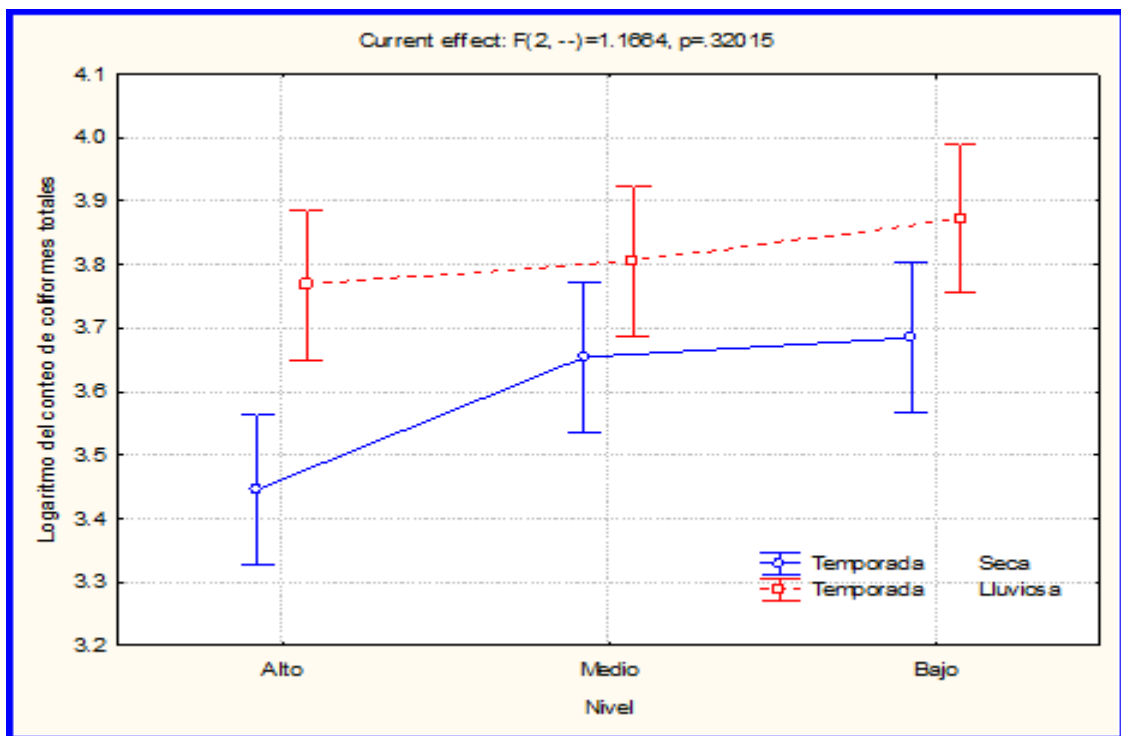


Figura No. 9: Variación del Conteo de Coliformes entre los puntos del río y época

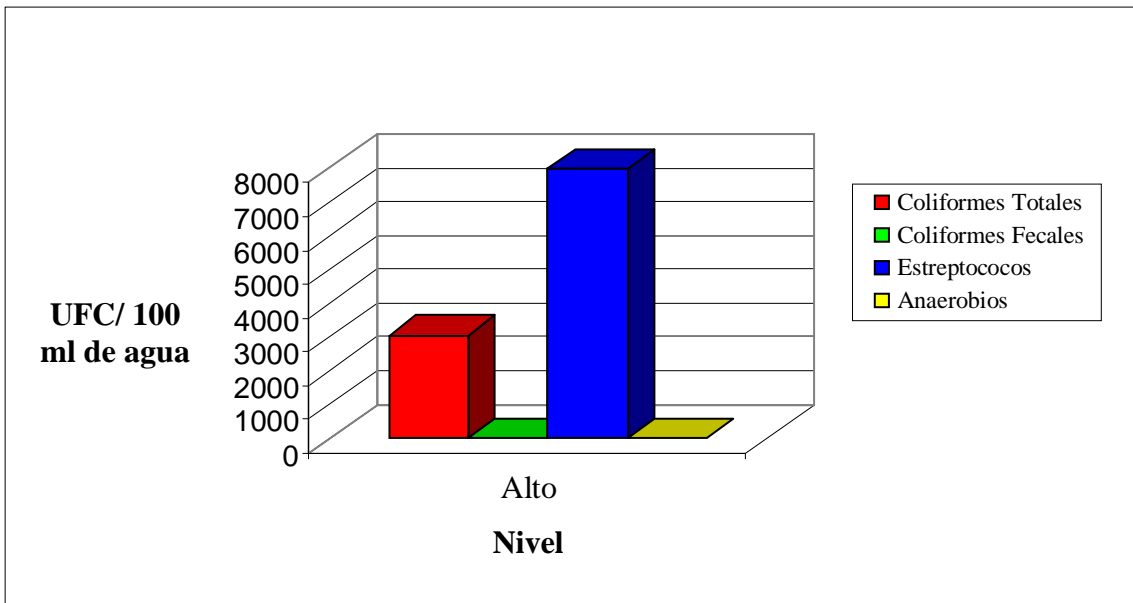


Fig. No. 10: Evaluacion de bacterias indicadoras para la parte alta del rio

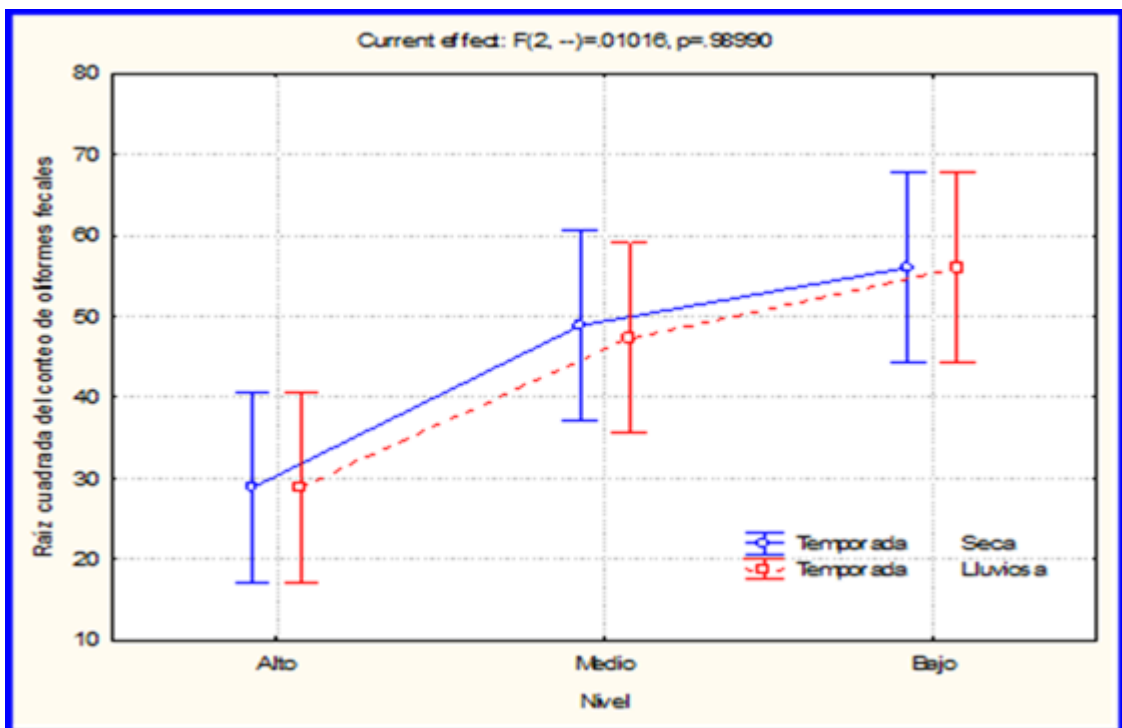


Figura No.11: Variación del Conteo de Coliformes fecales (Termotolerantes), entre las épocas y puntos de monitoreo del rio La Villa

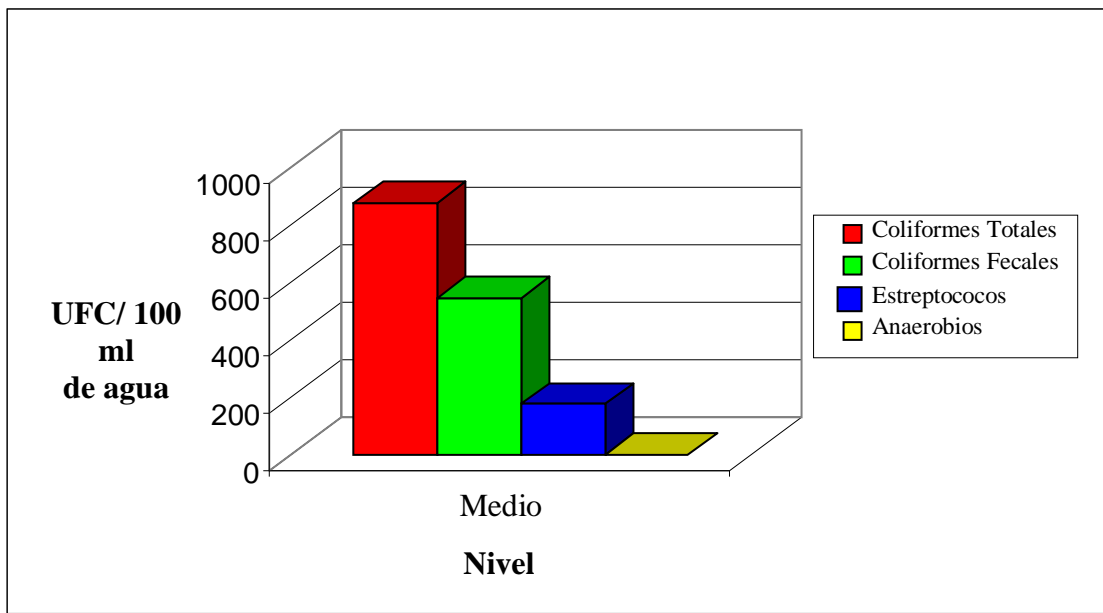


Fig. No. 12 Evaluacion de bacterias indicadoras en la parte media del rio, en época seca

Con respecto a los niveles del río para las dos épocas del año, los resultados arrojaron que en la Cuenca de Río La Villa hay diferencias significativas entre los puntos estudiados, se puede decir que los Coliformes Totales tienen una prioridad de crecimiento en la parte media y baja del río para la época seca, no así para la época lluviosa; ya que estos arrojaron un mayor crecimiento en la parte alta, esto lo confirma un estudio realizado por la ANAM y JICA, (2002 y 2003) (**Figuras No. 7,8,9,10,11y12**). Mientras que para los Coliformes Fecales, se observó mayor ocurrencia en el punto bajo del río para la época seca, esto puede ser corroborado por un estudio efectuado por la ANAM, (2007), donde concluyó que el grado de contaminación del río en la parte baja es mayor o supera los límites de normalidad, (**Fig. No.12 y 13**). Para los Estreptococos se obtuvo mayor crecimiento en la parte alta del río para ambas épocas.

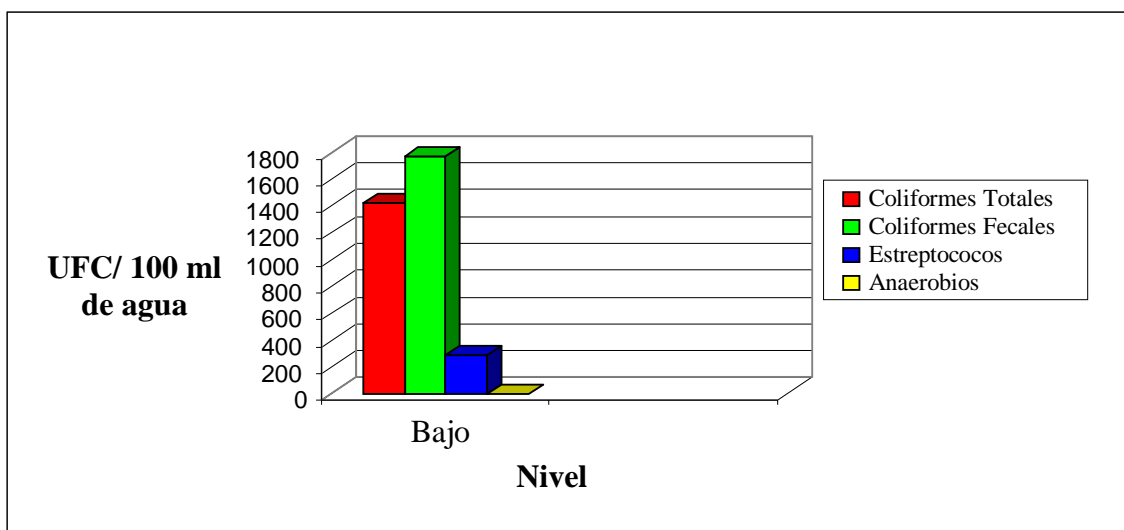


Fig. No.13: Evaluación de bacterias indicadoras en la parte baja del río-época seca

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación de los indicadores en la cuenca del río La Villa entre los niveles de río, para la época lluviosa se observó que hay diferencias significativas entre los niveles para todos los indicadores estudiados, con excepción de los Estreptococos en la parte media y baja del río, ya que podemos decir que no hay diferencias significativas entre estos dos puntos, **(Figuras No. 14 y 15)**. Para los coliformes Totales y fecales se observó mayor ocurrencia en la parte media y baja **(Figuras No. 15 y 16)**.

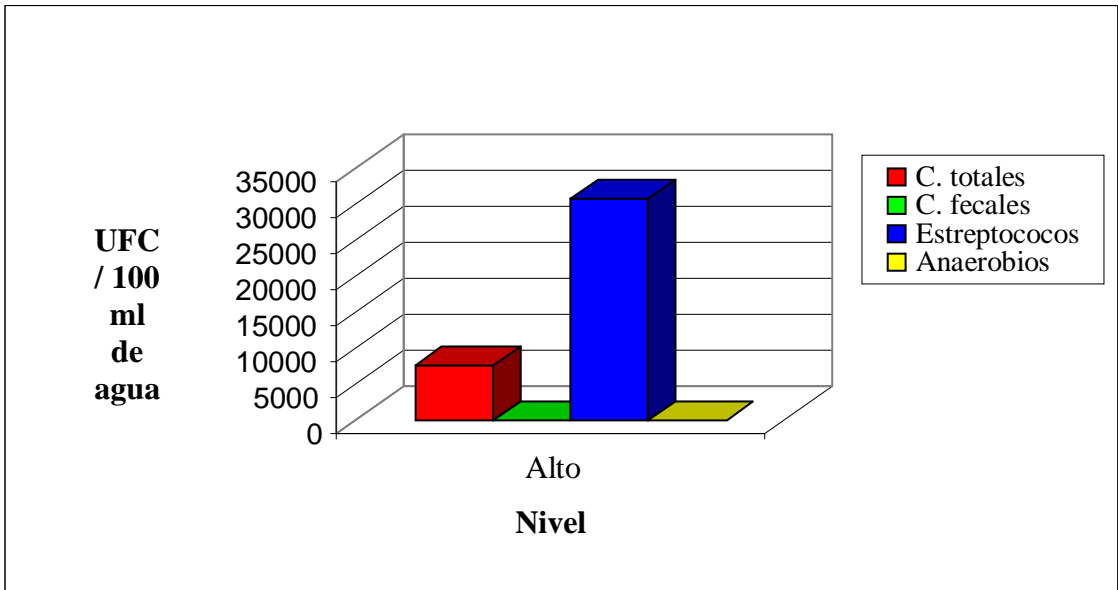


Fig. No.14: Recuento de Bacterias indicadoras en la parte alta del rio para la época lluviosa

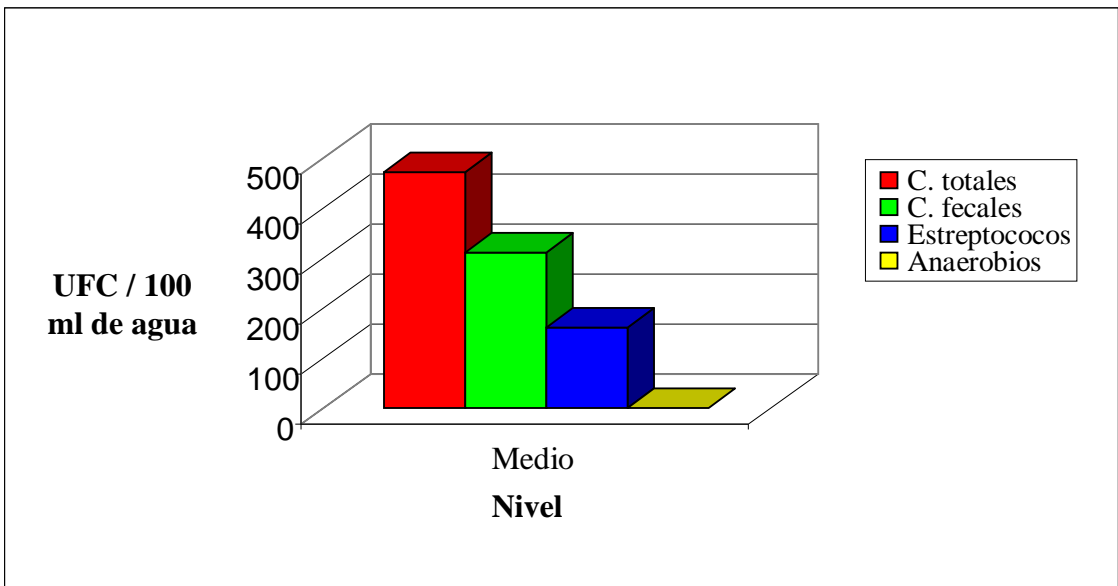


Figura No. 15: Recuento de bacterias indicadoras en el nivel medio del rio para la época lluviosa

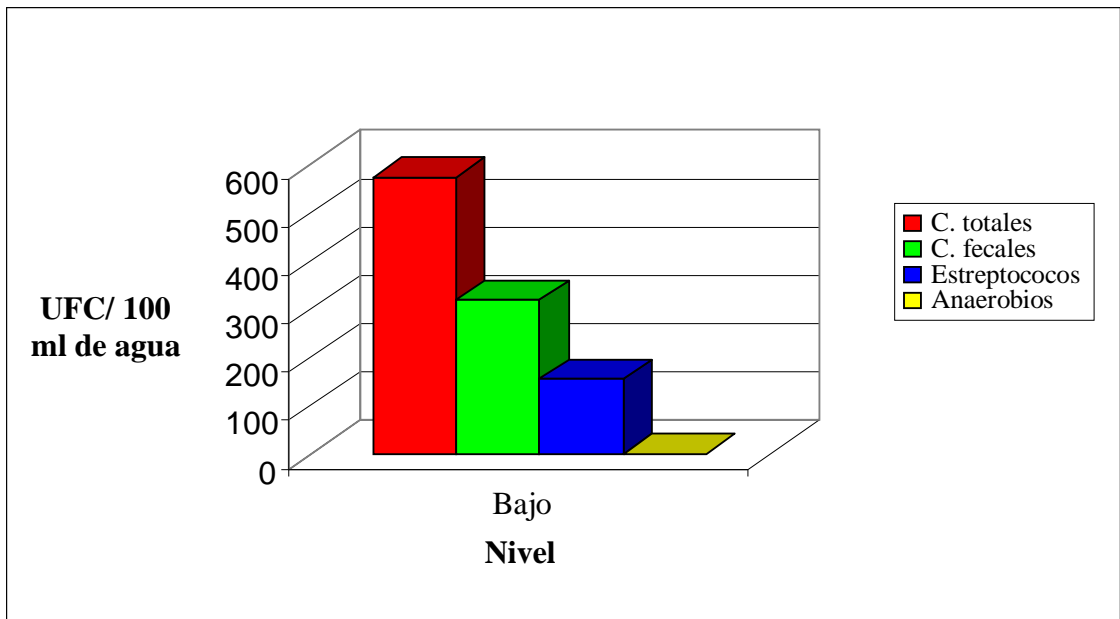


Figura No. 16: Recuento de Bacterias indicadores en la parte baja del rio, para la época lluviosa

Luego del Analisis Jerarquico (Conglomerado-Cluster), en el correspondiente dendrograma (Fig.No.17), se observan dos grandes grupos: El Grupo de La Corneta y Las Cabras; y el Grupo del Tahuara, Paso Viejo y Los Olivos , todos en su parte media. De acuerdo a esta figura observamos que son muy diferentes en términos de *Streptococcus* sp. (ocurrencia-abundancia). En el caso del grupo de la izquierda, observamos que El Tahuara y Paso Viejo son menos diferentes.

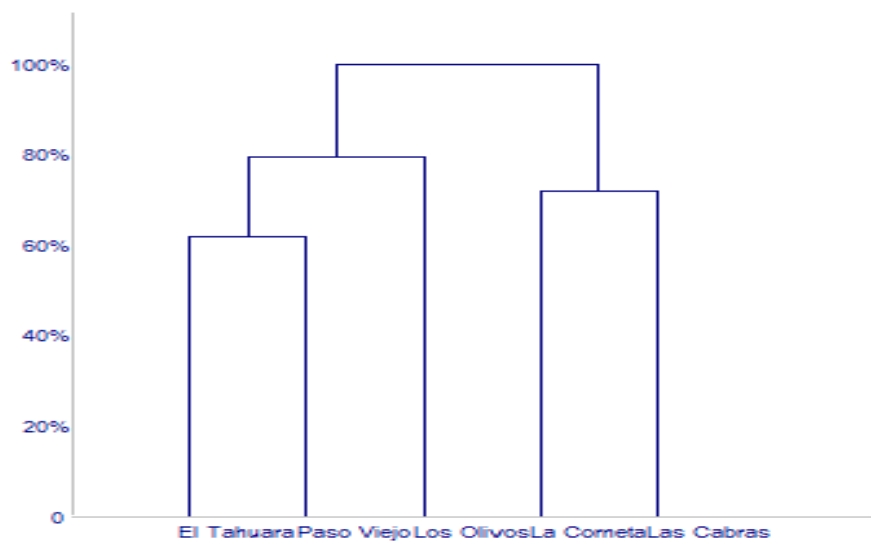


Fig.No.17 Análisis de Conglomerado (WARD, BRAY-COURTIS) para *Streptococcus* spp por sitio de muestreo.

3.2. Evaluación de bacterias patógenas

En cuanto a la evaluación de microorganismos patógenos, los resultados de las dos bacterias patógenas estudiadas, para esta investigación en los niveles altos, medio y bajo del río son también apreciados en la Figura No. 18, en la parte alta no se encontraron ocurrencias, la bacteria *Salmonella spp* que tiene mayor cantidad en los dos niveles, presenta su mayor cantidad en el nivel medio del río tres veces la encontrada en el nivel bajo. Mientras que *Vibrio spp* se encontró en menor cantidad en comparación con *Salmonella spp*

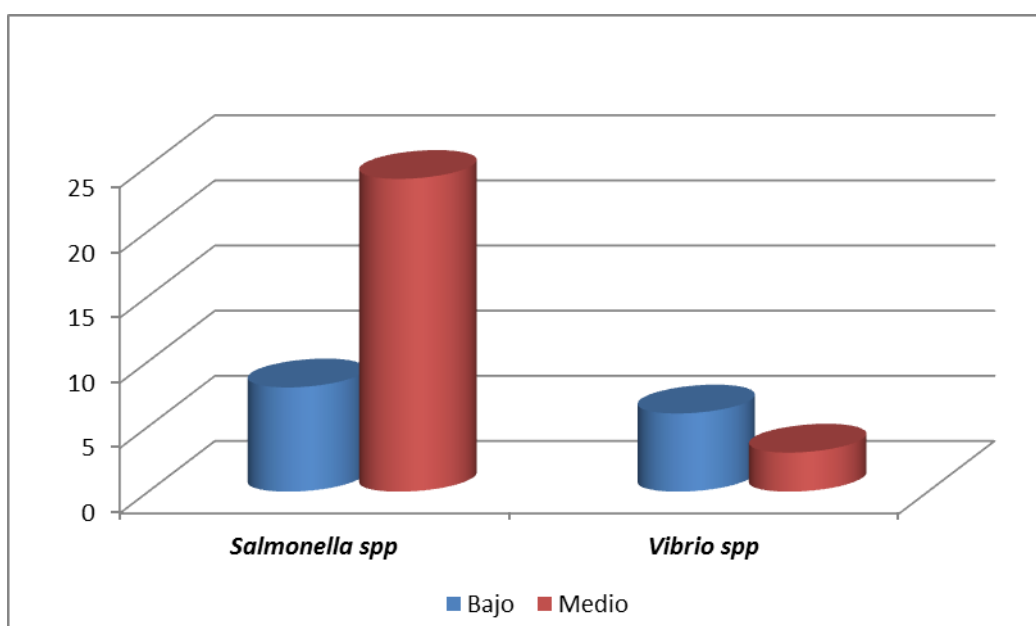


Fig. 18: Distribución de la cantidad de bacterias patógenas *Salmonella spp* y *Vibrio spp* .por nivel del río.

Cuadro N°6 Aislamientos de bacterias patógenas en la época seca y lluviosa.

ÉPOCA	Frecuencia	%
Lluviosa	18	43.9
Seca	23	56.1

El valor de X^2 calculada = 0.61 que tiene una probabilidad = 0.432

Al evaluar las dos frecuencias, la época seca y lluviosa, el análisis de X^2 no encontró suficiente evidencia en este experimento para indicar que existe diferencia significativa entre las dos épocas (Cuadro No.6).

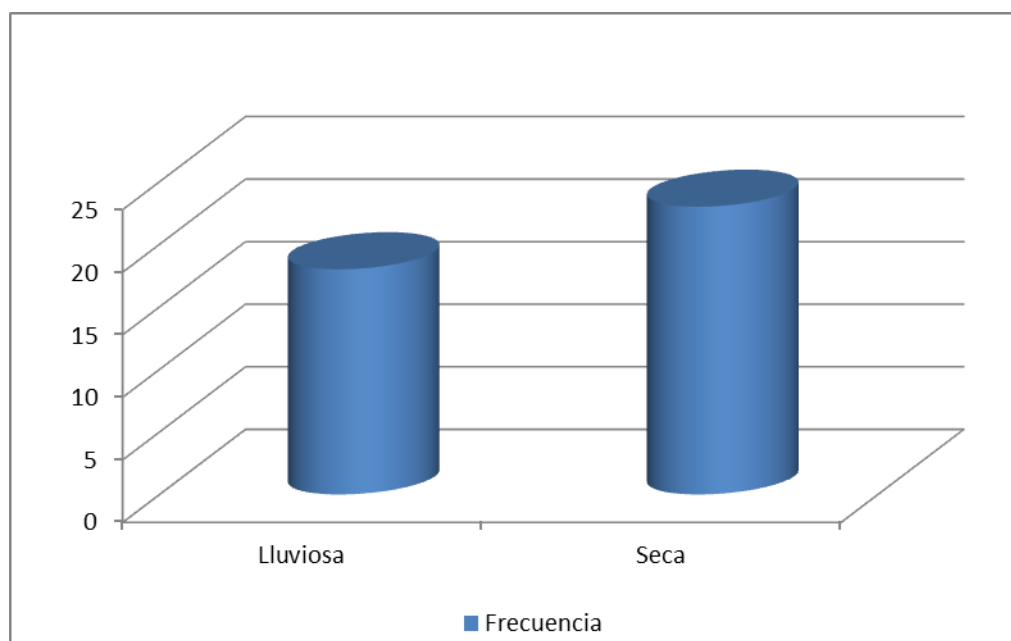


Fig. N°19: Aislamiento de bacterias patógenas en la época seca y lluviosa.

Esta figura muestra la frecuencia de bacterias aisladas en la época seca en comparación a la lluviosa, se puede observar que en la época seca hubo mayor aislamiento de patógenos.

Cuadro N°7 Distribución de la cantidad de bacterias patógenas *Salmonella spp* y *Vibrio spp* por las época.

Época	<i>Salmonella spp</i>	<i>Vibrio spp</i>
Lluviosa	16	2
Seca	16	7

La ocurrencia de *Salmonella spp* y *Vibrio spp* en las épocas seca y lluviosa se comparan en el **Cuadro N°7**. Es importante indicar que la *Salmonella spp* no parece tener preferencias entre las dos estaciones, mientras que en el caso de *Vibrio spp* aparecen en mayor cantidad en la época seca.

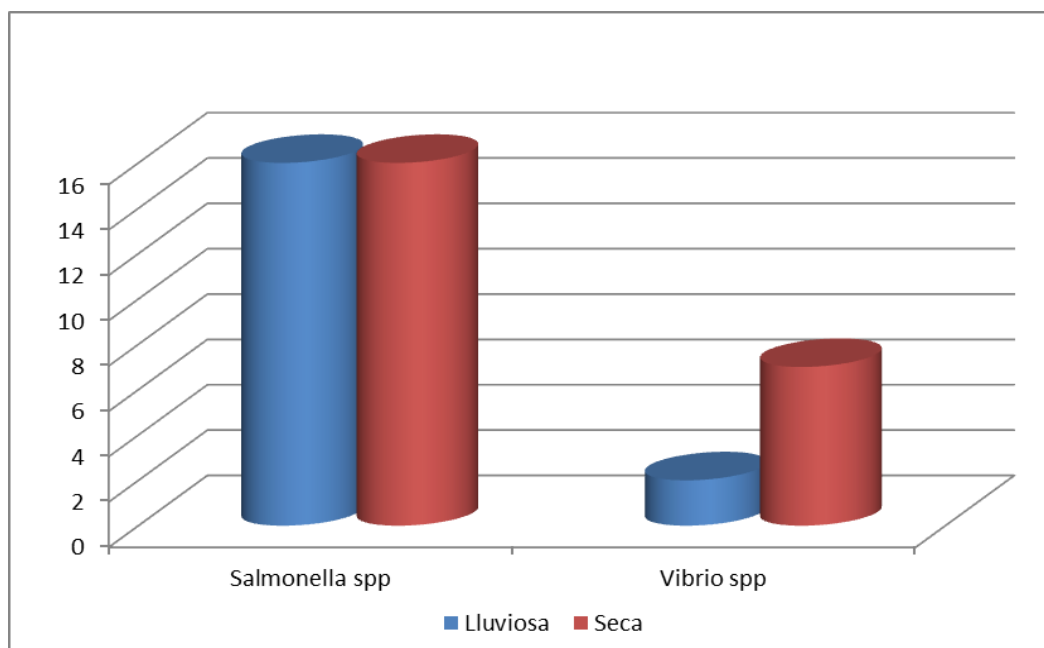


Figura No.20: Distribución de la cantidad de bacterias patógenas *Salmonella spp* y *Vibrio spp* para las época seca y lluviosa.

Se puede observar que *Salmonella spp* no discrimina entre épocas ya que se obtuvo la misma cantidad de bacterias aisladas, en tanto que *Vibrio spp* se obtuvo un mayor aislamiento durante la época seca en comparación con la lluviosa.

Cuadro N°8 distribuciones de los conteos para las bacterias patógenas *Salmonella spp* y *Vibrio spp* por sitio de muestreo.

Localidad	<i>Salmonella spp</i>	<i>Vibrio spp</i>
Chupa1	2	0
Chupa2	11	0
Los Olivos	3	2
PB1	4	3
PB2	4	0
PB3	8	4
total	32	9
%	78.05	21.95

En el Cuadro N°8 presentamos los resultados de las dos bacterias (*Salmonella spp* y *Vibrio spp*) por sitio de muestreo. En total se observa que *Salmonella spp* tiene mayor presencia que *Vibrio spp* y esto es así en todos los sitios de muestreo, la mayor cantidad de *Salmonella spp* las encontramos en Chupa 2 y parte baja (PB3)

). Se destaca en estos resultados que en tres sitios de muestreo no se encontró *Vibrio spp.*

De manera colateral la investigación evaluó la microbiota que se encuentra asociada a las captaciones de agua de las Plantas Potabilizadoras Roberto Reyna y Rufina Alfaro, ubicadas en las Provincias de Herrera y Los Santos, respectivamente durante la época seca y lluviosa. Los resultados encontrados demuestran que no hay gran variedad y diversidad de la microbiota asociada a las tomas de agua de las plantas potabilizadoras para ambas épocas como se muestran en las gráficas de abajo.

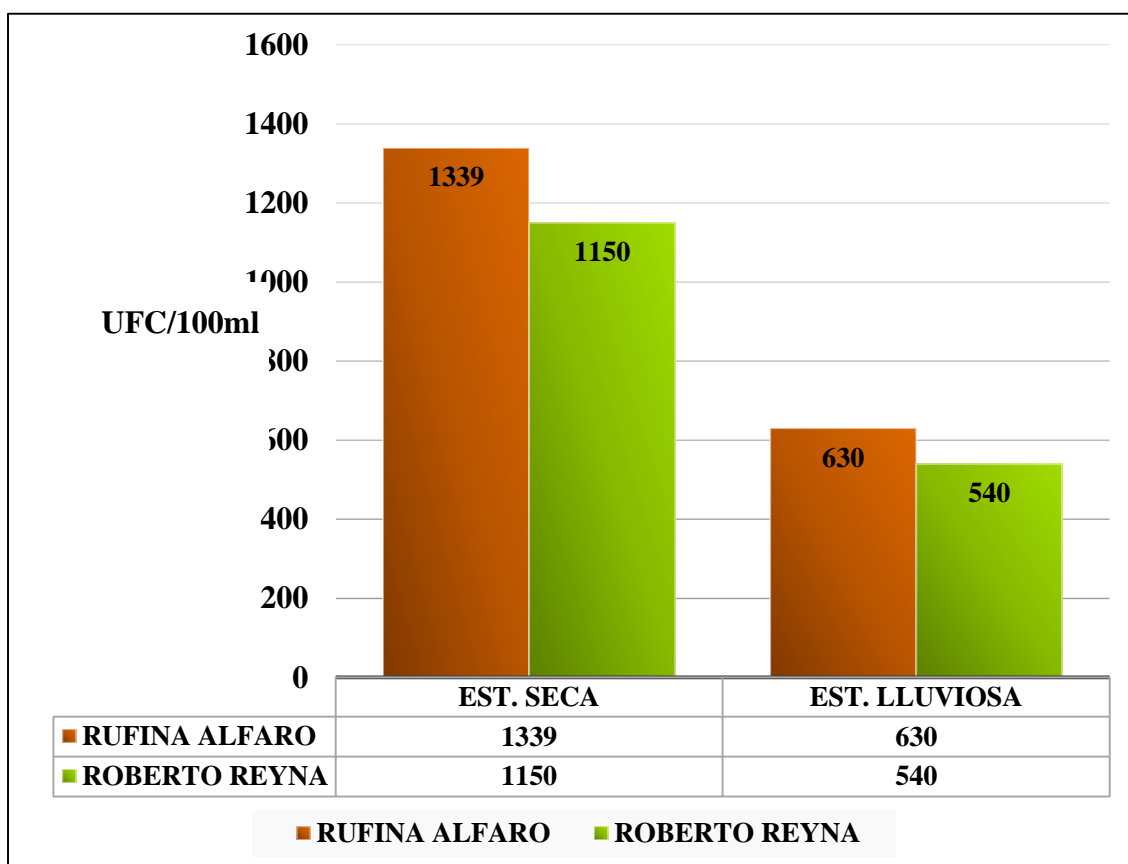


Figura N°21. Comparación de los niveles de coliformes totales en las tomas de agua Rio La Villa, de las plantas potabilizadora para ambas épocas.

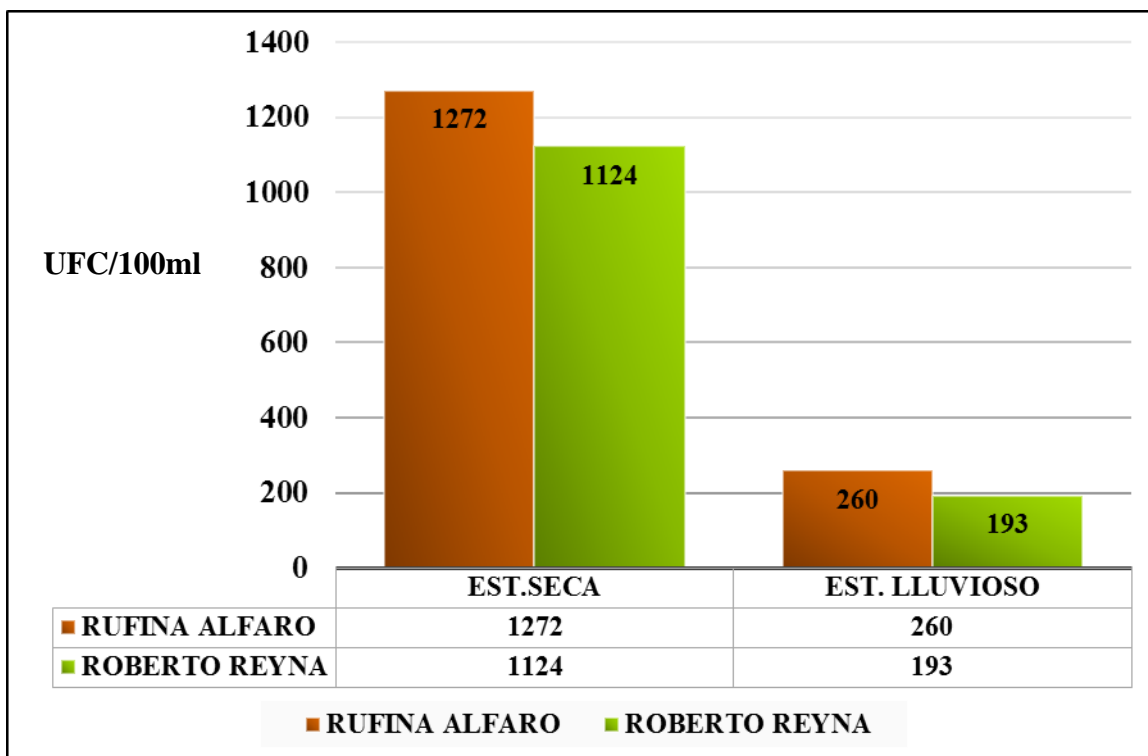


Figura N°22. Comparación de los niveles de coliformes fecales en las tomas de agua de las Potabilizadoras Roberto Reyna y Rufina Alfaro para ambas épocas.

En las Figuras No.21 y 22 se observa que estadísticamente no hay diferencias significativas entre las tomas de agua de las diferentes potabilizadoras, pero sí entre las épocas de estudio, ya que en la época seca es donde se dio el nivel más alto de estos microorganismos. Según un estudio realizado por De la Cruz, (2008) en la Cuenca del Río La Villa se concluye que los coliformes totales se encuentran en mayor concentración para la época seca con respecto a la época lluviosa. En este mismo sentido la toma de agua de la potabilizadora Rufina Alfaro fue la que presentó mayor incremento de coliformes totales, debido a que los puntos de muestreo se encontraban dentro de las actividades ganaderas, porcina y sembradíos agropecuarios., contribuyendo así al aumento de estos microorganismos, a diferencia de la toma de agua de la potabilizadora Roberto Reyna donde los resultados obtenidos fueron bajos, podemos decir que se debe al tipo de actividades que se realizan con menor frecuencia en esta área.

En las figuras 23 y 24, se puede observar que de todos los aislamientos de bacterias que se hicieron para la época seca en las dos tomas de agua, el género *Salmonella spp.*, fue el que mayormente se encontró. Los microorganismos del género

Salmonella spp., están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades. Todas las salmonelas son potencialmente patógenas (Stanchi, 2007).

En cuanto a la época lluviosa el género *Klebsiella spp.*, (Figuras.No.23 y 24) fue quien predominó con un mayor porcentaje para ambas tomas de agua. Esta bacteria se encuentra por todas partes en la naturaleza, puede ser debido a los serotipos microbianos distintos que desarrollan las adaptaciones específicas del lugar, con las adaptaciones bioquímicas asociadas que los hacen mejor adaptados a un ambiente particular (Bagley, 1985). Se pueden encontrar en el agua, el suelo, las plantas, los insectos, los animales y los seres humanos.

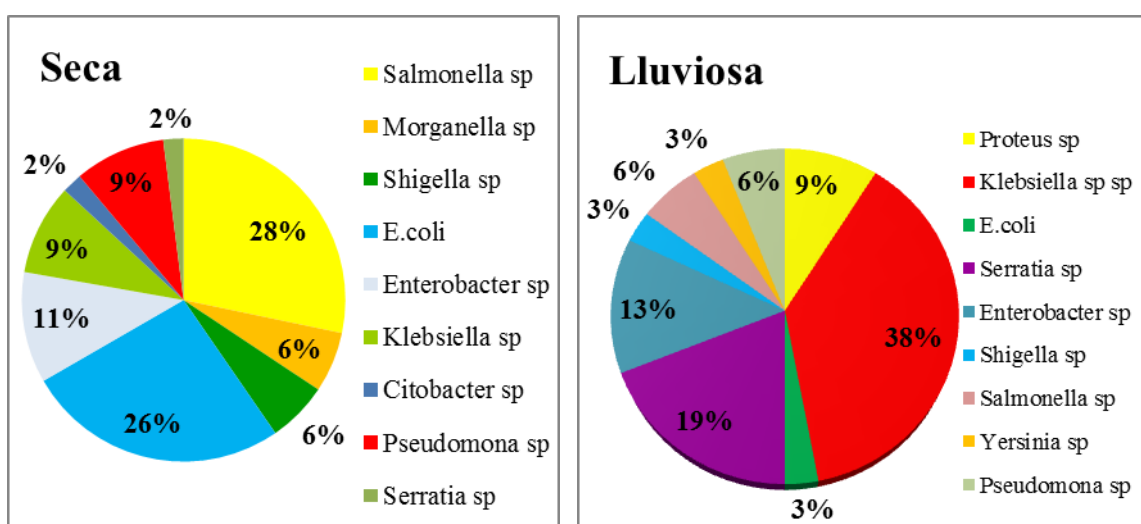


Figura No.23. Ocurrencia de géneros bacterianos aislados en la toma de agua de la Potabilizadora Ing. Roberto Reina durante las épocas.

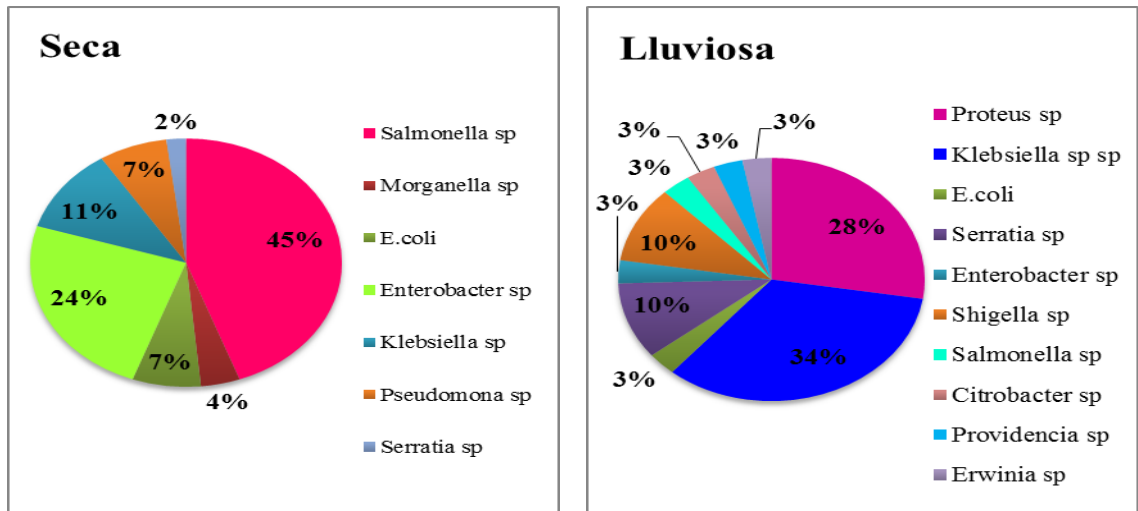


Figura No.24. Ocurrencias de géneros bacterianos aislados en la toma de agua de la Potabilizadora Rufina Alfaro durante las épocas

3.1 Parámetros Físico Químicos

Los resultados para los parámetros físicos-químicos arrojaron que no son significativos para ambas épocas; pero si en los niveles altos, medio y bajo del río, ya que en algunos casos la temperatura y el pH aumentaban y en otros puntos bajaba, pero siempre se mantuvo constante. Estos parámetros no tuvieron ningún efecto en los indicadores microbianos estudiados, (**Figuras No. 25, 26 y 27**) para el pH y (**Figuras No. 28, 29 y 30**) para la temperatura, respectivamente

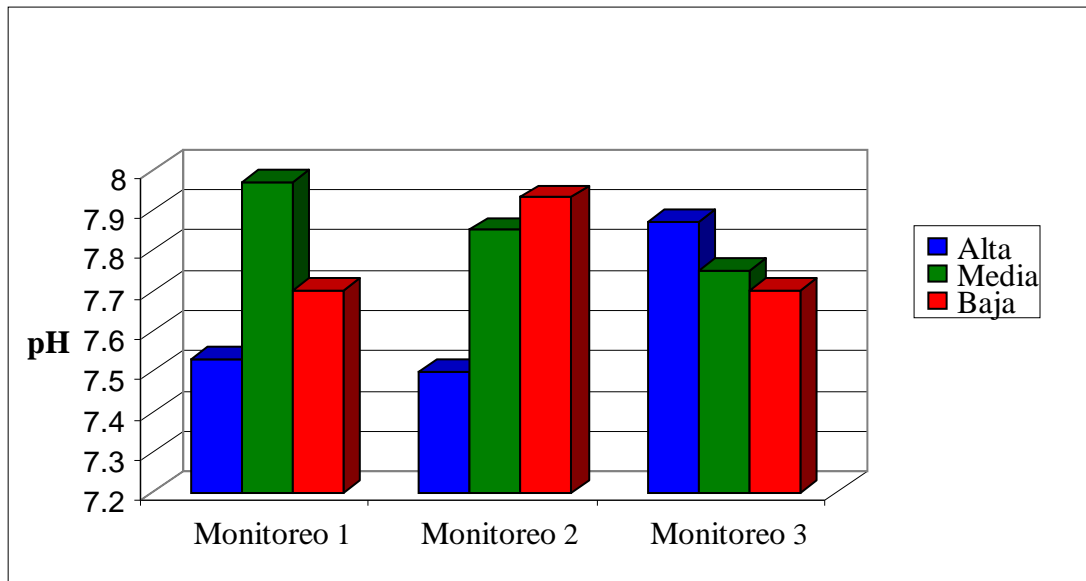


Figura No. 25. Evaluación del pH a nivel de los diferentes puntos de muestreo de la cuenca del Río La Villa en la época seca

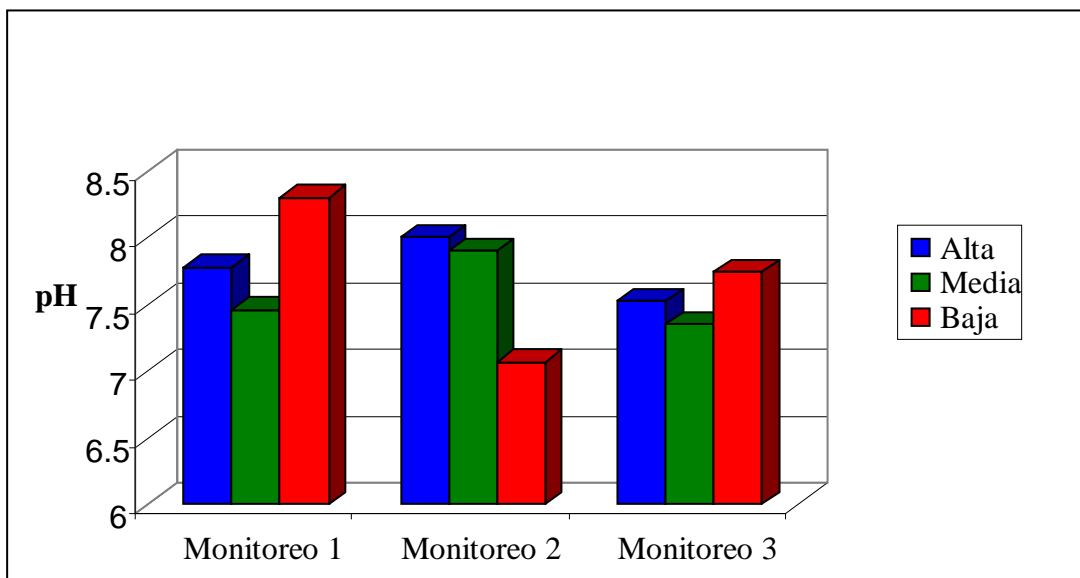


Figura No. 26. Evaluación del (pH) a nivel de los diferentes puntos de muestreo de la cuenca del Río La Villa en la época lluviosa

El pH no demostró diferencias significativas al nivel de 5% de probabilidad, en ambas épocas del año, el mismo se mantuvo constante como se observa en las figuras de arriba.

A nivel de sitios podemos observar que el pH en Los Olivos de la parte media y Tres Puntas de la parte alta, respectivamente, se encuentran en un rango de 7.5 – 7.6, son pH con un rango cercano a la neutralidad o neutros, mientras que para el sitio ubicado

en la parte baja, a la altura de La Represa Empresa La Nestlé (El Higuieron), el pH registro un valor muy elevado, con tendencia alcalina. Lo que demuestra la alta actividad agrícola y ganadera común alrededor de este sitio, que se observó, sumado a ellos los procesos de iluviacion con las escorrentías que permiten que los suelos se laven y se drenen las aguas al río, contribuyendo así a elevar el pH (**Fig.No.27**).

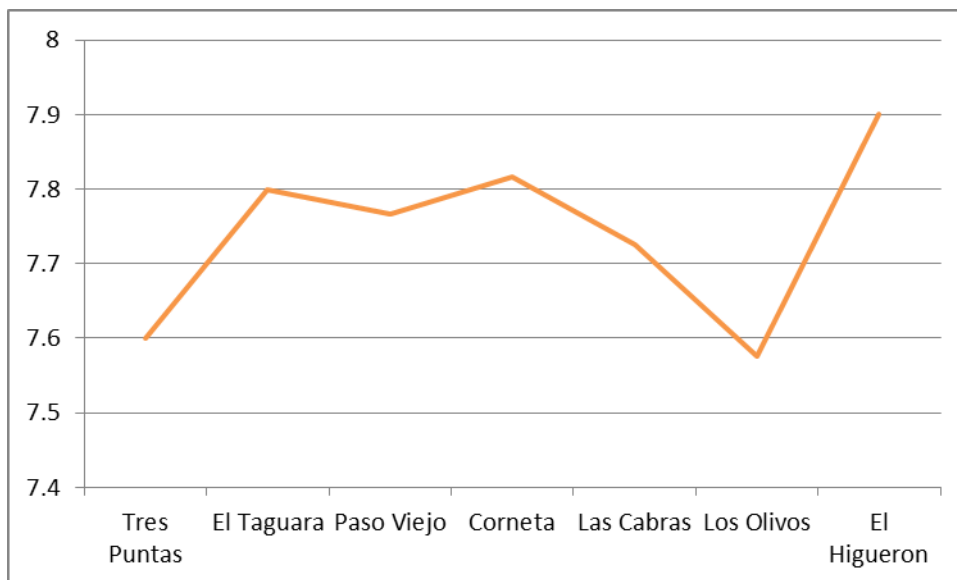


Fig.No.27: Valores del pH por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa

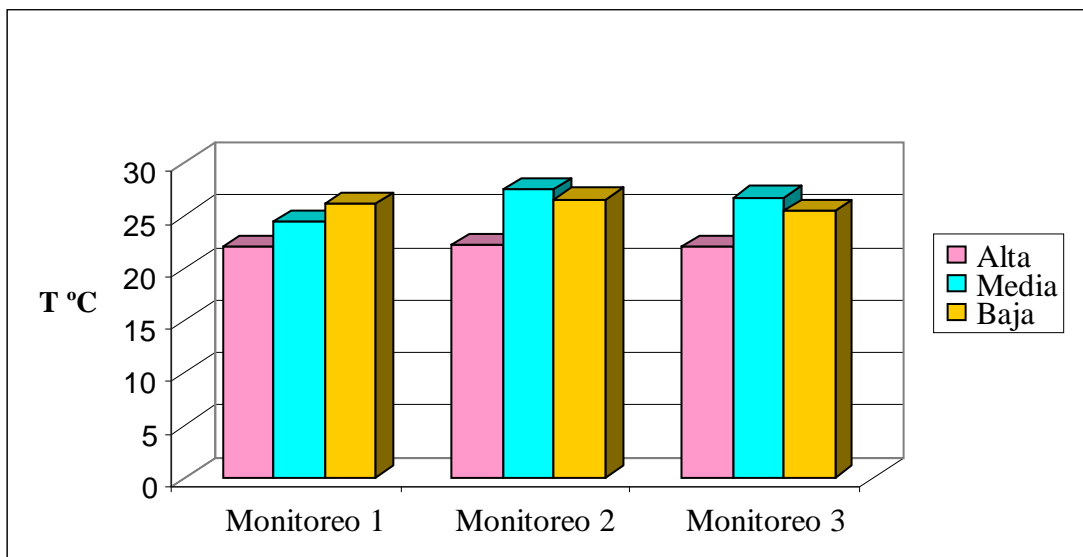


Figura No. 28. Evaluación de la temperatura en los diferentes, niveles de muestreo en la cuenca del río La Villa en la época lluviosa

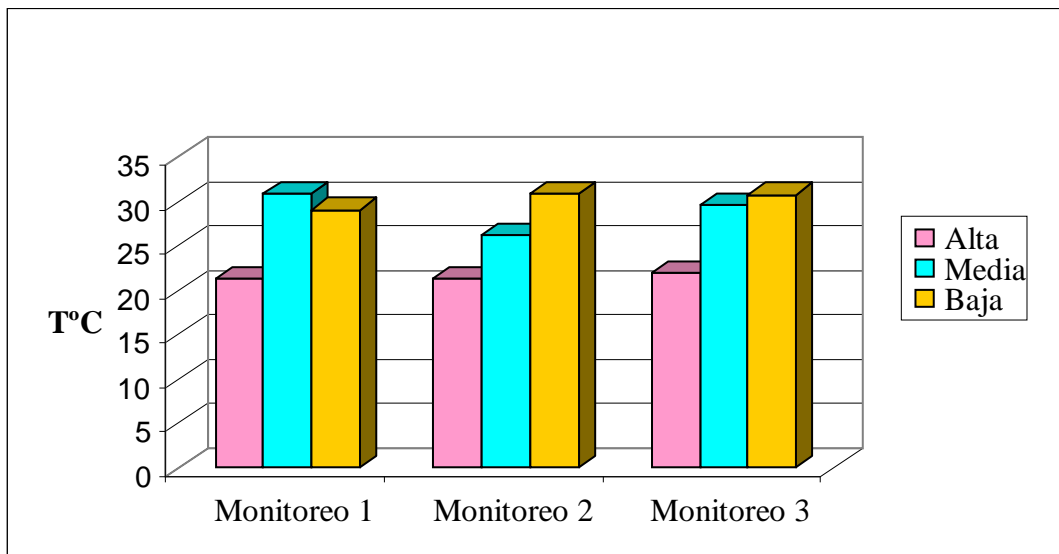


Figura No. 29. Evaluación de la temperatura en los diferentes niveles de muestreo en la cuenca del río La Villa, para la época seca

Para la temperatura tampoco hubo diferencias significativas, se puede observar en las (Figuras No. 28 y 29) que se mantuvo constante.

Para el sitio Tres Puntas, ubicado en la Reserva Forestal El Montuoso, de la parte alta del río, el valor de la temperatura fue más bajo, mientras que en los sitios Las Cabras ubicado en la Represa de Alcoholes del Istmo y Los Olivos de la parte baja y media respectivamente, los valores de la temperatura oscilan más altos, esto es lógico ya que en esta zona del río se registran los fenómenos de deforestación, quema y tala por parte del hombre, trayendo como consecuencias la incidencia directa del sol sobre el curso del agua en las riberas del río. Lo contrario al sitio Tres Puntas (Fig.No.30)

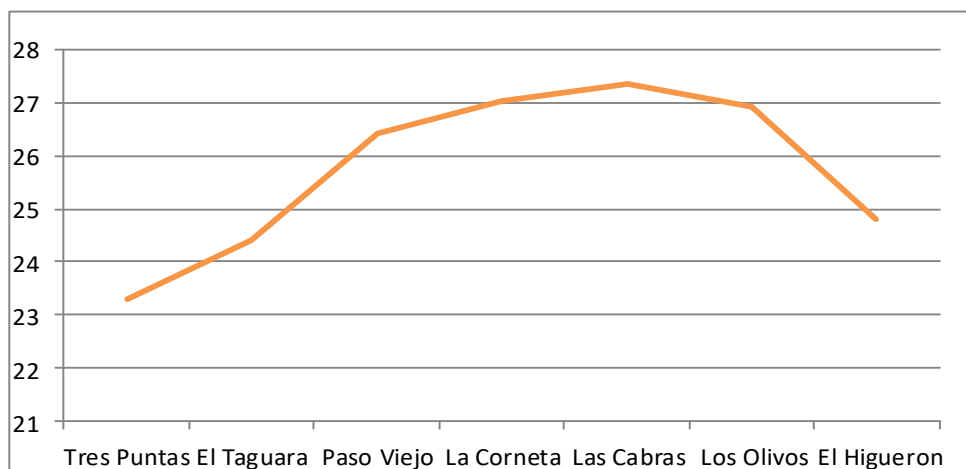


Fig. No.30: Valores de la temperatura por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa desde enero de 2016 a diciembre de 2016

Respecto al parámetro oxígeno disuelto, para el sitio ubicado en la parte baja de la Represa de La Empresa La Nestlé se presentó un menor porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, esto probablemente debido a que es en este sitio donde se le atribuye posiblemente la mayor cantidad de desechos. Por otro lado, en el sitio Tres Puntas, parte alta del río se obtuvo el mayor porcentaje de saturación de oxígeno (Fig.No.31)

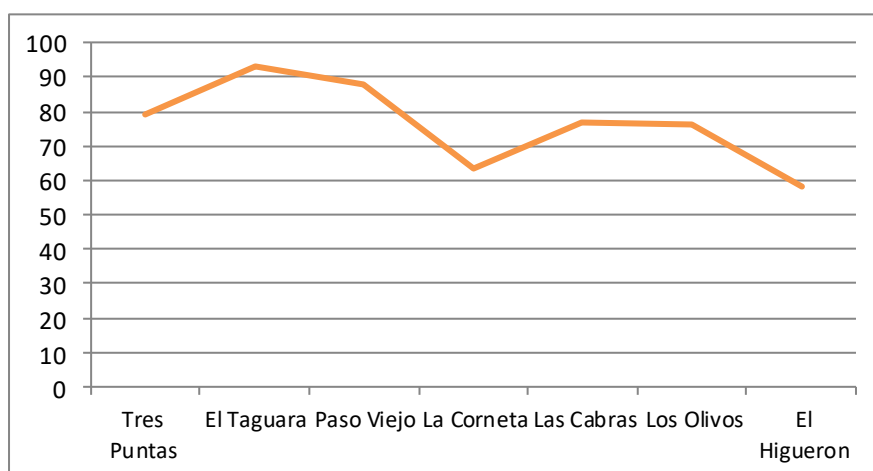


Figura No.31: Porcentaje de saturación de oxígeno, por mes de muestreo, a lo largo del río La Villa, desde enero de 2016 a diciembre de 2016.

Para el sitio Tres Puntas en su parte alta del río, se presentó el menor nivel de alcalinidad, lo contrario al sitio Paso Viejo, parte media donde se observa el nivel más elevado de la alcalinidad en todos los muestreos realizados (Fig.No.32)

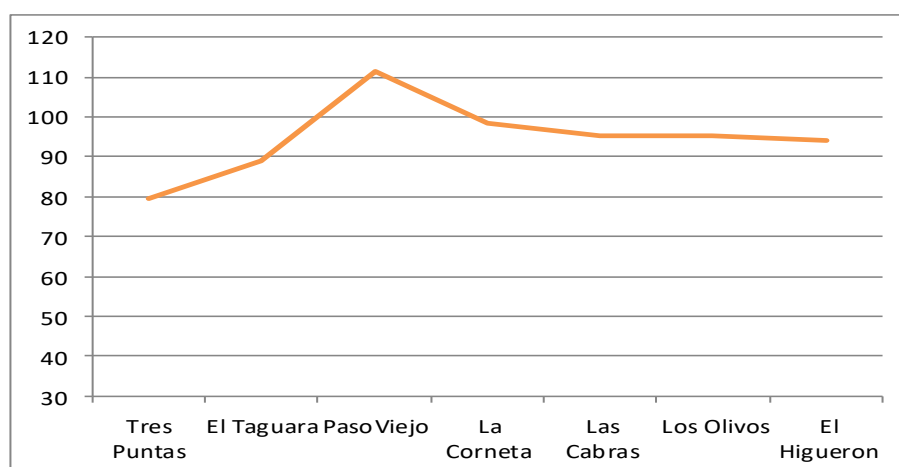


Figura No.32: Valores de la alcalinidad, por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa desde enero de 2016 a diciembre de 2016.

Para el sitio La Tahuara, parte media del río, el valor de la turbiedad fue más elevado, esto probablemente por la sedimentación, porcino culturas, contaminación por basuras, residuos de fertilizantes producto de la intervención del hombre. Lo contrario a el sitio Tres Puntas, parte alta del río donde se registró el valor más bajo de la turbiedad (**Fig.No.33**).

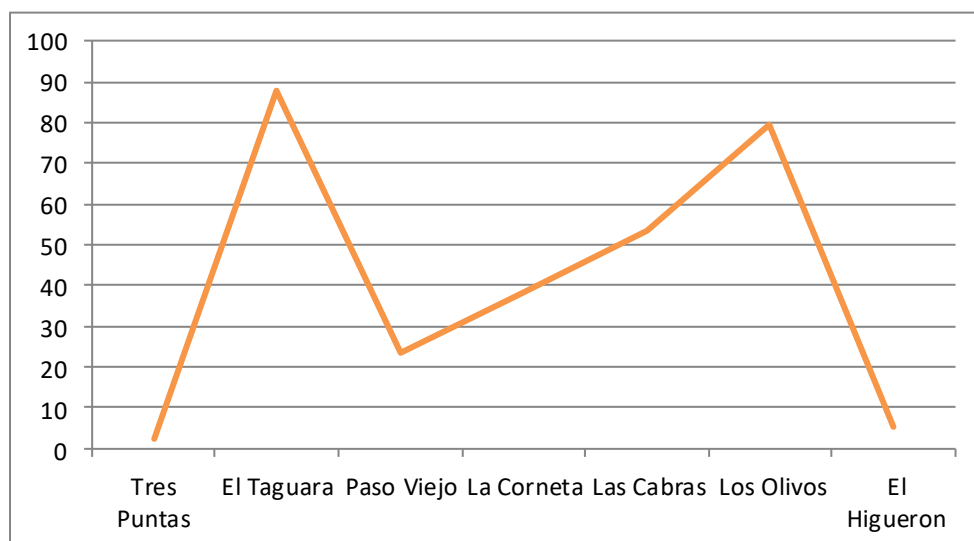


Figura No.33: Valores de la turbiedad, por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa desde enero de 2016 a diciembre de 2016.

Para el sitio ubicado en la parte baja a nivel de la Represa de La Empresa La Nestlé (El Higuaron) se presentó un alto rango de la conductividad. Por otro lado, en el sitio Tres Puntas, parte alta del río, la conductividad se registró en un menor rango, posiblemente es que este sitio es poco intervenido por el hombre lo contrario a las demás sitios de muestreos (**Fig.No.34**).

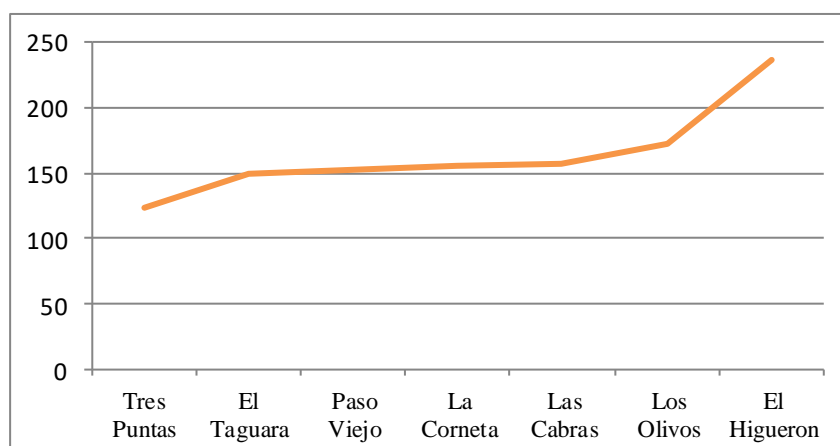


Figura No.34: Valores de la conductividad por sitio de muestreo, a lo largo del río La Villa, desde enero de 2016 a diciembre de 2016.

Con respecto a la relación que puedan tener los parámetros tomados en cuenta con los indicadores y patógenos, se observó que estos no afectan en nada al crecimiento de las bacterias indicadoras en la Cuenca del río La Villa; dado esto, podemos señalar que los parámetros físico-químicos son independientes de los indicadores (figuras No. 35 y 36) este hallazgo se encontro en la investigación realizada en Chile por Rivera *et al.*, (2004).

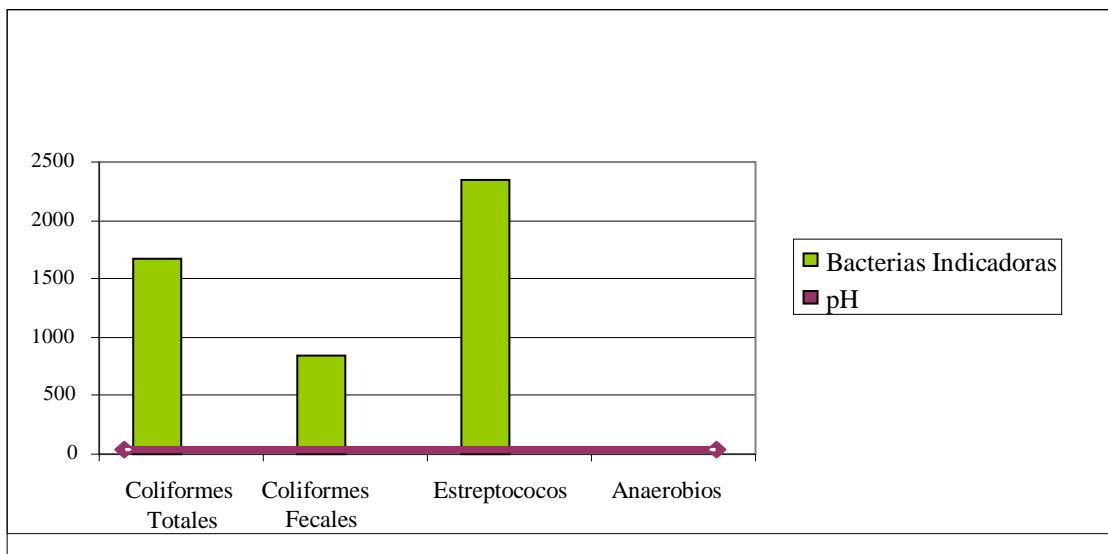


Figura No. 35. Comparación entre las Bacterias Indicadoras y el pH durante las dos épocas del año

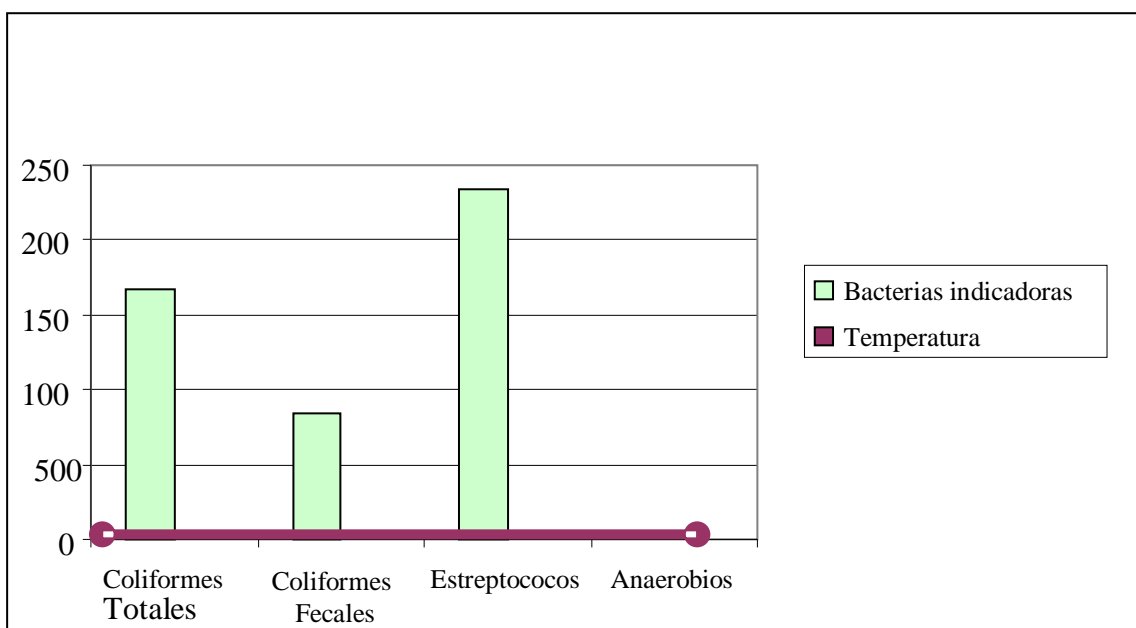


Figura No. 36. Comparación entre Bacterias Indicadoras y la temperatura en las dos épocas del año.

Adicionalmente, podemos observar que, para el análisis de conglomerado, en este estudio, se congregan los sitios de La Tahuara, Paso Viejo, Los Olivos, La Corneta y Las Cabras, formando la parte media, el sitio ubicado a la altura de La Represa de La Empresa La Nestlé, forma la parte baja, mientras que el sitio Tres Puntas ubicado en la Reserva Forestal el Montuoso, formando la parte alta del río La Villa (**Fig.No.37**).

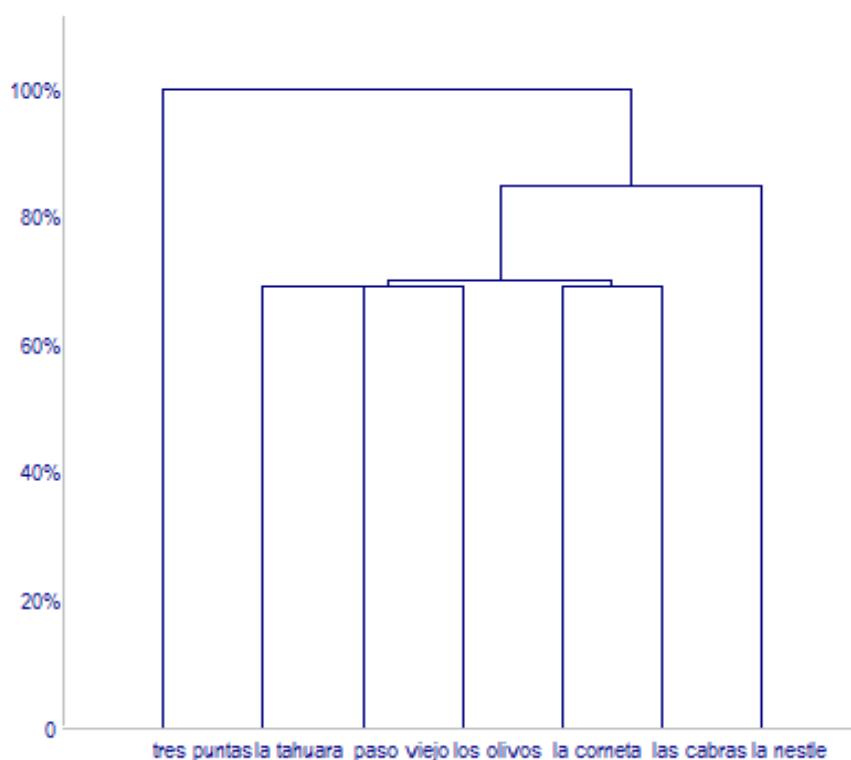


Figura.No.37 Análisis de conglomerado (WARD, BRAYT-COURTIS) para demostrar si existen zonas a lo largo del río La Villa.

De acuerdo con el análisis discriminante nMDS, observamos que los sitios de estudios se organizan en tres grupos bien diferenciados, a saber: El grupo A (conformado por el sitio Tres Puntas), el grupo B (conformado por la mayoría de los sitios) y el grupo C (conformado por el sitio Los Olivos); de estos el grupo B, presenta el mayor esfuerzo del muestreo.

CONCLUSIONES

1. El crecimiento de Bacterias Indicadoras entre las dos épocas del año fue altamente significativo, a un 5% de probabilidad.
2. El crecimiento de Coliformes Totales fue altamente significativo para las dos épocas del año, con una mayor ocurrencia en la época lluviosa.
3. Con respecto a los niveles del río, se observó mayor ocurrencia de Coliformes Totales en la parte media y baja del río para la época seca y en la parte alta para la época lluviosa.
4. El crecimiento de Coliformes Fecales fue altamente significativo para la época seca, no así para la lluviosa.
5. Se determinó mayor ocurrencia de Coliformes Fecales en el nivel bajo del río.
6. El crecimiento para *Streptococcus* fue altamente significativo para ambas épocas, con una mayor ocurrencia en la época lluviosa.
7. Los niveles más altos de *Streptococcus* sp se encontraron en la parte baja, específicamente a la altura de la represa La Nestlé.
8. De los siete puntos muestreados a lo largo del Río la Villa, el sitio con la mayor ocurrencia de *Streptococcus* spp., fue El Higuérón ubicado en la Parte baja de la Represa la Nestlé. La mayor ocurrencia probablemente se debe a las descargas de desechos orgánicos e inorgánicos (ganadería, porciculturas) entre otros, trayendo consecuencias a la bioaumentación de microorganismos.
9. Con respecto a los puntos de muestreo se observó mayor crecimiento en la parte alta de la Cuenca.
10. El crecimiento para los Anaerobios no fue significativo ya que de este no se detectó crecimiento.
11. En el sitio Tres Puntas en la Reserva Forestal el Montuoso, se determinó una alta saturación de oxígeno, observándose lo contrario en la parte baja de la Represa La Nestlé.
12. En la época seca hubo mayor aislamiento de patógenos.
13. Se encontró que la frecuencia de bacterias patógenas en el nivel medio es 27 y el nivel bajo es 14, la frecuencia de bacterias en el nivel medio es 65.9%, y en el nivel bajo es sólo el 34.1%.

14. No se encontraron diferencias significativas entre los muestreos para los patógenos aislados.
15. Respecto al nivel bajo, la diferencia entre las dos bacterias no es apreciable con un valor de 8 para *Salmonella spp* y 6 para *Vibrio spp*, como lo es en el nivel medio del río donde se tienen 24 *Salmonella spp* y sólo 3 de *Vibrio spp*.
16. Según los parámetros físico-químicos tomados en cuenta como el pH y la temperatura se mantuvieron constantes.

RECOMENDACIONES

1. Realizar proyectos que puedan indicar la calidad microbiológica entre los niveles del río, sobre otros indicadores que puedan existir en esta cuenca.
2. También tomar en cuenta otros parámetros físico-químicos, en otros estudios que se realicen en esta cuenca, como oxígeno disuelto, turbiedad, conductividad, DBO, plomo, entre otros.
3. Observar los efectos que tengan los parámetros físico-químicos entre las dos épocas del año y entre los niveles del río, como también la relación que tengan con los indicadores.
4. Medir las diferencias que se puedan observar entre los indicadores estudiados y otros indicadores en futuras investigaciones.
5. Hacer estudios sobre otros Anaerobios, utilizando otros métodos de detección.
6. Por último, se debe tomar conciencia de que el agua es el recurso hídrico más importante en nuestra vida, por lo que se recomienda cuidarlo y protegerlo, ya que sin este no somos nada.

Bibliografía

1. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. Waterborne Pathogens, AWWA MANUAL M48: *Vibrio cholera*. 2006. 123-128 pp.
2. ANAM, Informe final tomo III. *Elaboración de Normas de Calidad Ambiental para Aguas Naturales*. Estudios Técnicos y Científicos. CSI Ingenieros, 2007. Consultado el 13 de Agosto del 2010.
3. ANAM, Arden & Price Consultoría, *Proyecto Piloto de la Calidad de agua de la Cuenca del Río La Villa*, 2001. Consultado el 3 de julio del 2009.
4. ABRAMOVICH, G., HAYDE; CARRERA L., NEPOTE; GÓMEZ V., CONTINI. (2000). *Cryptosporidium y Giardia en aguas superficiales*. Consultado el 20 de noviembre del 2010. Disponible en http://www.drwebsa.com.ar/aam/rev_033/vol_033_03/033_06.htm.
5. BROCK, M., ; MADIGAN T., MARTINKO J., JACK P. 2004. *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Págs. 579 y 927.
6. CARACHO, MARTA; SEGURA, LUIS; MOYANO, PATRICIA; SERENELLI, Edith. (2002). *Recurso Hídrico Superficial: Efectos por Actividades Antrópicas- Área Gran Catamarca*. Libros de Resúmenes 1º, Jornadas Universitarias de Ingeniería. Pág. 33. Consultado el 10 de Mayo del 2010.
7. CARTO, ANTONIO MARTINEZ. 2007. *Microbiología*. Tlahuittepec. Consultado 24 de Abril 2011. Disponible en <http://www.slidoshare.net/guest70b2db/microbiología>.
8. CARRASCAL, A. K.; PAÉZ, A.; BURBANO, M. 2003. *“Manual de Laboratorios: Microbiología de Alimentos.”* Edición. Bogotá, Colombia. Págs. 13-17.
9. CENTRO PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES (CDC); Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (NCID); Organización Panamericana de La Salud (OPS). Métodos de Laboratorio par el Diagnostico de *Vibrio cholerae*.
10. CONAMA, (2000). Comisión Nacional del Medio Ambiente. *Anteproyecto de Norma de Calidad para la protección de las aguas continentales superficiales*. Exenta N° 198. Retirada Junio 2003 para observaciones (2000). Consultado el

- 30 de Octubre del 2011. Disponible en http://www.scielo.php?pid=S0718-07642004000500013&script=sci_arttext.
11. DOMÉNECH, X. (1994). *Química Ambiental. Impacto Ambiental de los Residuos*. 2ª edición. España. Pág. 254. Consultado el 15 de octubre del 2011.
 12. EATON, D.; CLESCERI, L.; GREENBERG, A. 1995. Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th edition: Membrane Filter Method. 9-37 – 9-38 pp.
 13. GELDREICH Y KENNER, 1996. “*Concepts of Fecal Streptococcus in Stream Pollution*” (*Conceptos sobre los estreptococos fecales en la contaminación de corrientes*). *Jornal Water Pollution Control Federation*. 41:R336-R352.1969. Consultado el 15 de septiembre del 2010).
 14. GELDRICH, 1996. *La Amenaza Mundial de los Agentes Patógenos transmitidos por el Agua*. Consultado el 15 de Junio del 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2003000100011&script=sci_arttext#a10. pdf.
 15. GODFREE, A 1997. *Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water*. Consultado el 21 de Febrero del 2010. Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol40_1_02/hie07102.htm.
 16. GUZMÁN, QUINTERO. PALACIOS-VÉLEZ, R. CARRILLO-GONZÁLEZ, J. CHÁVEZ-MORALES. NIKOLSKII-GAVRILOV. 2007. *La contaminación del agua superficial en la Cuenca del Río Texcoco*, México, *Agrociencia* 41: 385-93. Consultado el 3 de Septiembre del 2010. Disponible en la Revista Química viva- Número 1, año 8, abril 2009- quimica@gbfcen.uba.ar.
 17. Gunther, (1996). *Calidad del Agua Potable en América Latina. Ponderación de los Riesgos Microbiológicos contra los Riesgos de los Subproductos de la Desinfección Química*. Consultado el 15 de Junio del 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2003000100011&script=sci_arttext#a10. pdf.
 18. GRUPO SANTEÑO; *Boletín Ambiental*, 2007. Consultado el 20 de mayo de 2010. Disponible http://Azueropanama.tripode.com/n_Ambiental1.pdf. 2010.
 19. I.P.N. (1991). *Manual de prácticas de microbiología sanitaria*. Departamento de microbiología de la ENCB. México. Pág. 250. Consultado el 3 de julio del 2010.

20. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA, Gobierno de Chile. (1992). “*Métodos de Filtración por Membrana para determinación de Coliformes y E. coli en agua*”. (Consultado 25 de junio de 2010). (En línea). Santiago Chile. Disponible en: http://www.ispch.d/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-009.pdf.
21. JAY, J, (1992). *Indicadores de la calidad y de la inocuidad microbiológica de los alimentos*. Parte IV, Capítulo 17. Microbiología Moderna de los Alimentos, 3ª edición. Págs. 497-503. Consultado el 13 de Abril del 2010.
22. LENNETTE, E.; BALOWS, A.; HAUGLER, W.; SHADOMY, J. 1985. Manual of clinical microbiology fourth edition: *Vibrio*. Ed. ASM. Washington, DC, United States. 282-301 pp.
23. FLORES, L. 2003. Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas en ambientes marinos. Universidad Nacional de San Marcos, Lima – Perú. Consultado el día 17 de Marzo de 2011. Disponible en: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2003/flores_al/pdf/flores_al.pdf
24. MAYER, R.; PEPPER, I.; GERBA, CH. 2009. Environmental microbiology second edition: Environmentally Transmitted Pathogens. Department of soil, water and environmental science, University of Arizona. Tucson Arizona. 445-495 pp.
25. MITROVICH, C.; DE GAMUNDI, A.; SILVA, C.; BINSZTEIN, N. 2010. Microcrustáceos y *Vibrio cholerae* O1 viable no cultivable (VNC): resultados en la Cuenca del Río Salí, Tucumán, Argentina. Revista Scielo. 38(1):71-80 pp. Consultado el día 20 de marzo de 2011. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-560X2010000100007&script=sci_arttext
26. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD: Organización Mundial de La Salud.1987. Guía para la calidad del agua potable volumen 2: Aspectos Microbiológicos. 3-38 pp.

27. LECLERC H, DEVRIESE L; MOSSEL, D (1996). *Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococcus and streptococcus: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water*. Consultado el 1 de Mayo del 2010.
28. LOMELÍ AND TAMAYO, (2006). *Contaminación del agua*. Consultado el 13 de Marzo del 2010. Disponible en http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/CAgua.html.
29. SUÁREZ PITA, MARITZA; (2001). *Tendencia actual de Estreptococos como Indicador de contaminación fecal. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología*, Ciudad de la Habana, Cuba. Consultado el 20 de Febrero del 2011.
30. MADIGAN J., MARTINKO Y PARKER J. (2004). *Biología de los Organismos*, Prentice Hall, Madrid. Consultado el 15 de Octubre del 2011.
31. MINISTERIO DE ECONOMÍA Y FINANZAS. *Norma de Calidad Ambiental y Niveles de Calidad para las aguas continentales de uso recreativo con y sin contacto directo*. Gaceta oficial: 26078, publicada el 08 de julio del 2008. Consultado 02 de Marzo del 2011.
32. MORA, DARNER; PORTUGUEZ, CARLOS; BRENES, GUSTAVO (2002). *Evaluación de la Calidad Microbiológica del Río Grande de Térraba*. Revista Costarricense de Salud Pública, 2003. Consultado el 14 de Agosto del 2010. Disponible en http://www.scielo.php?pid=S0301-732X2003000100011&script=sci_arttext#a10.
33. MORA, DARNER; (1994-1995). *Contaminación fecal del Río Reventazón*. Publicado en 1997 por la Revista Costarricense de Salud Pública. Consultado el 11 de Agosto del 2011. Disponible en http://www.scielo.php?pid=S0301-732X2003000100011&script=sci_arttext#a10.
34. MORA, DARNER; (1998). *Actualización de Criterios Microbiológicos para Evaluar las Aguas en sus Diferentes Usos*. Revista Costarricense de Salud Pública. Consultado 11 de Agosto del 2011. Disponible en http://www.scielo.php?pid=S0301-732X2003000100011&script=sci_arttext#a10.
35. NIEMI, NIEMELA; (1995). *Growth of Enterococcus, Lactococcus and Streptococcus strains and environmental isolates in liquid media and their*

- reactions on BEEA*. Int J Food Microbiol 1994; 23:71-8. Consultado el 4 de Enero del 2011.
36. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, (OMS), (2004). *Guías para la calidad del agua potable*. Volumen 1. 3° Ed. Ginebra, Pág. 101. Consultado el 30 de Octubre del 2011.
37. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1998. *Guías para ambientes seguros en aguas recreativas Vol. 1: Aguas costeras y aguas dulces*. Consultado el 23 de Agosto del 2010.
38. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD: Organización Mundial de La Salud.1987. Guía para la calidad del agua potable volumen 2: Aspectos Microbiológicos. 3-38 pp.
39. PÉREZ-LÓPEZ, BURCIAGA-SIQUEIROS, MEDINA-HERRERA, MARTÍNEZ-PRADO, AND GONZÁLEZ-SÁNCHEZ. (2003). *Evaluación del contenido de oxígeno y coliformes fecales en el agua del río El Tunal en Durango México*. Consultado el 13 de marzo del 2010. Disponible en http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/Ciudad%20Obregon/CONTAMINACION_AMBIENTAL/CA079.doc .
40. RIVERA. N, (1992). *Calidad y reconocimiento básico de aguas. El Árbol, nuestro amigo*. Consultado el 25 de Octubre del 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642004000500013&script=sci_arttext.
41. SEQUEIRA, MARCOS; RODRÍGUEZ, ARTURO; (2002). *Informe de Monitoreo y Aforos en los Ríos de la Cuenca 24*. San José. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Agosto 2002. Consultado el 18 de Septiembre del 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642009000400009&script=sci_arttext.
42. TERCER INFORME DE MONITOREO de la *Calidad de agua de las Cuencas Hidrográficas de Panamá* (2006 y 2007). Pág. 163, Cuenca N° 128 Río La Villa. Consultado el 4 de junio del 2010. Disponible en http://www.azueropanama.org/participa/Entries/2008830_Disponibilidad_del_recurso_agua_para_2020.html.

43. VILLEE, A. (1996). **Biología**. 8ª edición, editado en México. Consultado el 25 de Julio del 2010. Disponible en <http://web.uct.ac.za/microbiology/manual/MolBio1Manual.htm>.

Anexos

Cuadro No.9 Resultados obtenidos en la época seca, para las Bacterias Indicadores, en los tres niveles de la Cuenca del Río La Villa, entre los meses de enero, febrero y marzo (2016) y octubre, noviembre y diciembre (2016).

Monitoreo	Época seca	Niveles	Bacterias indicadoras de agua			
			Coliformes Totales	Coliformes Fecales	Estreptococos	Anaerobios
No. 1	No. 1					
	1	1	3300	0	7400	0
	1	1	2000	0	5500	0
	1	1	4200	0	8500	0
No. 2	1	1	4100	0	8400	0
	1	1	3100	0	13300	0
	1	1	1900	0	16100	0
	1	1	4000	0	11500	0
No. 3	1	1	2800	0	1200	0
	1	1	2000	0	1500	0
	1	1	1100	0	3000	0
	1	1	4000	0	11000	0
No. 1	1	2	4200	0	8500	0
	1	2	1900	600	300	0
	1	2	1500	1400	300	0
	1	2	700	0	300	0
No. 2	1	2	1800	1000	500	0
	1	2	200	2800	400	0
	1	2	700	500	100	0
	1	2	900	0	200	0
No. 3	1	2	1500	1200	0	0
	1	2	100	500	0	0
	1	2	700	100	100	0
	1	2	300	100	400	0
No. 4	1	2	1200	300	0	0
	1	2	200	0	100	0
	1	2	700	100	100	0
	1	2	300	0	0	0
No. 1	1	2	1300	100	0	0
	1	3	2000	2700	300	0
	1	3	1000	1000	500	0
	1	3	1900	1200	900	0
No. 2	1	3	500	500	300	0
	1	3	2600	300	200	0
	1	3	1900	1900	100	0
	1	3	2400	3300	200	0
No. 3	1	3	1300	300	900	0
	1	3	1600	400	200	0
	1	3	500	1700	100	0
	1	3	200	10000	200	0
No. 3	1	3	600	100	0	0

No. 4	1	3	1500	900	300	0
	1	3	1000	900	0	0
	1	3	2000	1500	0	0
	1	3	1800	1600	300	0

Cuadro No.10 Resultados obtenidos sobre el crecimiento de Bacterias Indicadoras en la época lluviosa, para los tres niveles del río, en la Cuenca del Río La Villa entre los meses enero, febrero, marzo (2016) y octubre, noviembre, diciembre (2016).

Monitoreo	Época Lluviosa	Niveles	Bacterias indicadoras de agua				
			Coliformes Totales	Coliformes Fecales	Estreptococos	Anaerobios	
No. 1	No. 2	2	1	11400	0	34400	0
		2	1	6200	0	25800	0
		2	1	6800	0	32900	0
		2	1	7800	0	36800	0
No. 2		2	1	7300	0	27000	0
		2	1	6900	0	36000	0
		2	1	6300	0	32100	0
		2	1	6600	0	33900	0
No. 3		2	1	9500	0	21500	0
		2	1	8500	0	29500	0
		2	1	5900	0	30500	0
		2	1	8000	0	25800	0
No. 1		2	2	800	400	200	0
		2	2	800	500	500	0
		2	2	800	300	200	0
		2	2	900	300	300	0
No. 2		2	2	800	600	200	0
		2	2	600	400	0	0
		2	2	800	500	500	0
		2	2	100	900	600	0
No. 3		2	2	200	0	0	0
		2	2	500	0	0	0
		2	2	100	100	0	0
		2	2	200	100	0	0
No. 4		2	2	400	200	0	0
		2	2	400	600	0	0
No. 4		2	2	100	0	0	0
		2	2	100	100	100	0
No. 1		2	3	1100	600	900	0
		2	3	1000	200	300	0
		2	3	300	600	200	0
		2	3	1300	1000	700	0
		2	3	400	200	0	0

No. 2	2	3	600	400	0	0
	2	3	300	400	0	0
	2	3	700	600	100	0
No. 3	2	3	900	100	0	0
	2	3	600	400	0	0
	2	3	100	100	0	0
	2	3	200	100	100	0
No. 4	2	3	400	200	0	0
	2	3	1000	0	100	0
	2	3	200	100	0	0
	2	3	100	100	100	0

Para la prueba de rango múltiple de Duncan para los Coliformes Totales, las medias arrojaron que no son significativamente diferentes, pero con una mayor ocurrencia en la época dos, véase (**Cuadro No. 11**).

Cuadro No. 11 Prueba de rangos múltiples para los Coliformes Totales, en las dos épocas del año.

Duncan	Media	N	Época
A	39.300	44	2
A	38.093	44	1

Al comparar los rangos múltiples de Duncan para los Coliformes Fecales se observó que hay diferencias significativas entre ambas épocas, con un mayor crecimiento en la época seca, véase (**Cuadro No. 12**).

Cuadro No.12 Prueba de rangos múltiples para Coliformes fecal, en las dos épocas del año.

Duncan	Media	N	Época
A	20.022	44	1
B	11.632	44	2

Al hacer la comparación del rango múltiple de Duncan para los Estreptococos se puede determinar que hay diferencia significativa entre ambas épocas, con una mayor ocurrencia en la época lluviosa, véase (**Cuadro No. 13**).

Cuadro No.13 Prueba de rangos múltiples para Estreptococos en las dos épocas.

Duncan	Media	N	Época
A	53.836	44	2
B	32.306	44	1

A pesar de que el resultado que se obtuvo de los Anaerobios no fue significativo al hacer la prueba del rango múltiple de Duncan para ambas épocas se pudo observar que no son significativamente diferentes, o sea que son iguales para ambas épocas, véase (**Cuadro No. 14**).

Cuadro No.14 Prueba de rangos múltiples para Anaerobios en las dos épocas.

Duncan	Media	N	Época
A	0.7071	44	1
A	07071	44	2

Al realizar la prueba del rango múltiple de Duncan para los Coliformes Totales para los diferentes niveles del río se observa que hay diferencia significativa entre estos puntos,, con una mayor ocurrencia en la parte alta de la cuenca, véase (**Cuadro No. 15**).

Cuadro No.15. Prueba de rangos múltiples para coliformes Totales en los diferentes niveles de la cuenca.

Duncan	Media	N	Nivel del río
A	70.575	24	1
B	29.425	32	3
C	24.059	32	2

Para la prueba de rango múltiple para los Coliformes Fecales se observó diferencias significativas entre los niveles del río, con una mayor ocurrencia en la parte baja y media del río, véase (**Cuadro No. 16**).

Cuadro No.16 Prueba de rango múltiple para Coliformes Fecal en los tres niveles del río.

Duncan	Media	N	Nivel del río
A	26.402	32	3
B	16.592	32	2
C	0.707	24	1

La prueba de rango múltiple de Duncan para los Estreptococos arrojó que hay diferencias significativas para el nivel alto con respecto al nivel medio y bajo; mientras que el punto medio y bajo no son significativamente diferentes, con una ocurrencia mayor en el punto alto de la cuenca, véase (**Cuadro No. 17**).

Cuadro No. 17 Prueba de rango múltiple para Estreptococos en los diferentes niveles de la cuenca.

Duncan	Media	N	Nivel del río
A	129.544	24	1
B	11.383	32	3
B	9.904	32	2

A pesar de que para los Anaerobios no se obtuvo crecimiento al realizar la prueba de rango múltiple de Duncan se puede decir que hay diferencias significativas para el nivel alto con respecto al nivel medio y bajo; mientras que los puntos medio y bajo de la cuenca no son significativamente diferentes, véase (**Cuadro No. 18**).

Cuadro No.18 Prueba de rangos múltiples para Anaerobios en los tres niveles del río.

Duncan	Media	N	Nivel del río
A	0.7071	24	1
B	0.7071	32	2
B	0.7071	32	3

Cuadro No. 19 Datos del pH y la Temperatura, tomas en los tres puntos de muestreo durante la época seca.

Monitoreo	pH			Temperatura		
	Punto de muestreo			Punto de muestreo		
	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
No 1	7.53	7.5	7.87	21.4	21.3	22
No 2	7.97	7.83	7.75	30.9	26.2	29.6
No 3	7.7	7.93	7.7	29.1	30.9	30.8

Cuadro No.20 Datos del pH y Temperatura en los tres puntos de muestreo en la época lluviosa.

Monitoreo	pH			Temperatura		
	Punto de muestreo			Punto de muestreo		
	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
No 1	7.78	9.3	8.6	22	22.2	22
No 2	7.46	8.8	7.35	24.4	27.5	26.4
No 3	8.3	7.07	7.74	26.1	26.5	25.4

Cuadro sobre la localización de muestreo de los tres puntos de monitoreo, en los cuales se menciona las coordenadas, el uso que se le da al agua en los diferentes puntos y algunas recomendaciones.

Cuadro No.21 Localización de los puntos de monitoreo.

Punto	Lugar	Cuerpo de agua	Coordenadas (UTM)	Uso representativo del agua	Recomendaciones
1	Vivero Tres Puntas	Río La Villa	854755 N 522098 E	Según análisis preliminar, sirve para cualquier uso	Debido a que es cerca al inicio del Río La Villa, sirve de referencia.
2	Taguara	Río La Villa	855173 N 548566 E	Recreación, potencial uso para abastecimiento domestico.	Debido a que el agua entra en contacto directo con la población, este es un punto importante.
3	La Villa (Nestlé)	Río La Villa	879092 N 565091 E	Industrial, potencial uso para abastecimiento domestico.	Aguas debajo de descargas industriales y recreación.

Cuadro No.22. Clasificación de la calidad del agua según las Normas Internacionales tomadas en cuenta.

Punto	Lugar	Río	Clasificación según la Norma de Chile	Clasificación según la Norma de la Unión Europea	Nivel
1	Vivero Tres Puntas	Río La Villa	Clase de excepción		Alto
2	Taguara	Río La Villa	Clase 1: coliformes totales y	Categoría A1	Media

			fecales		
3	Nestlé	Río La Villa	Clase 3: causa, Coliformes fecales	Categoría A3: causa; Coliformes fecales	Baja

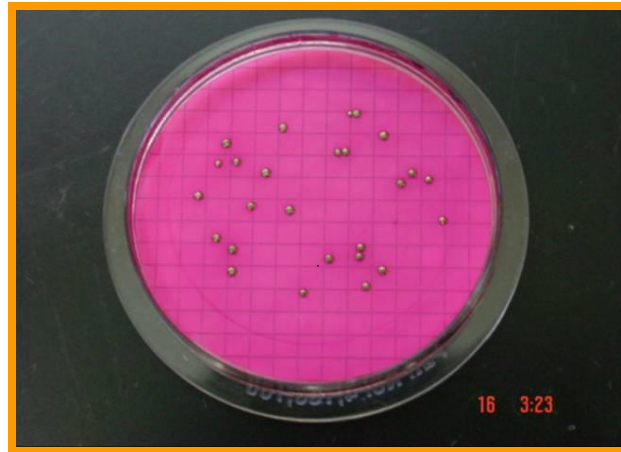


Figura No. 38. Crecimiento de colonias positivas para Coliformes Totales en agar Endoles.



Figura No. 39. Interpretación de colonias positivas para Estreptococos en agar KF para Estreptococos.



Figura No. 40. Punto alto de la cuenca en la reserva Forestal el Montuoso, Tres puntas



Figura No. 41. Punto medio de la cuenca del Río La Villa (La Taguara, Macaracas, Los Olivos).



Figura No. 42. Parte Baja de la cuenca del Río La Villa. A su izquierda represa Las Cabras y a su derecha El Higuerón detrás de la represa Nestlé



Figura No 43. Punto medio de la cuenca, durante el muestreo en la época lluviosa.



Figura no. 44: algunas fuentes puntuales de contaminación al rio la villa, durante las giras de la investigación



Figura No. 45: Toma de agua de las plantas potabilizadora Rufina Alfaro, con actividad agrícola



Figura No. 46. Evaluación físico químicos y microbiológica de las muestras de agua



Figura No. 47: Toma y conservación de muestra de agua en el campo



Figura No. 48. Técnica de Filtración para los análisis microbiológicos usados en la investigación.

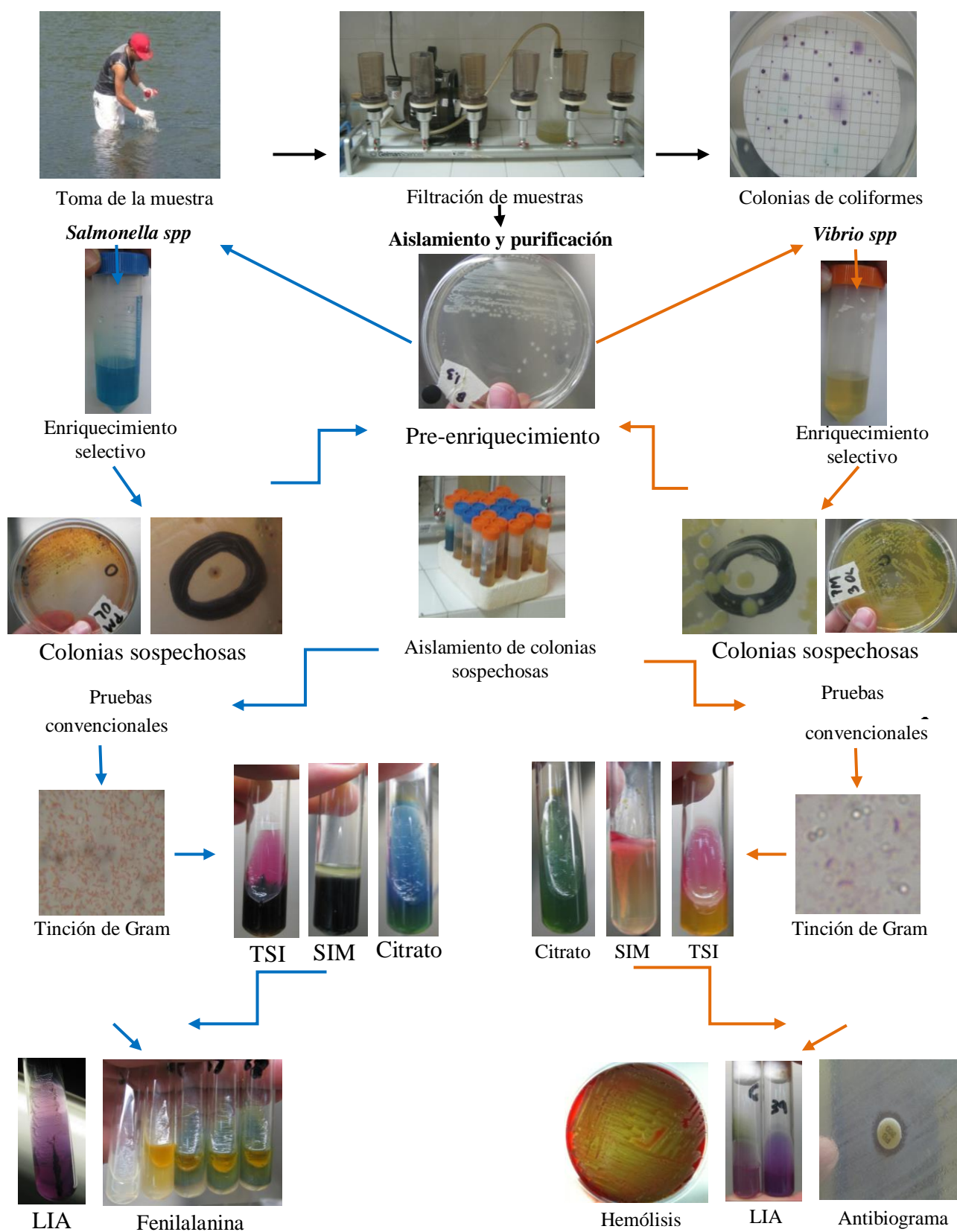


Figura No.49: Flujograma de la metodología aplicada para la evaluación de indicadores bacterianos y patógenos partir de muestras de agua del rio la villa