

Research Article

Microcrustáceos y *Vibrio cholerae* O1 viable no cultivable (VNC): resultados en la Cuenca del Río Salí, Tucumán, Argentina

**Cecilia Locascio de Mitrovich¹, Alcira Villagra de Gamundi¹, Clara Silva²
Marta Cecilia² & Norma Binsztein³**

¹Instituto de Limnología (ILINOA) de la Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.

²Instituto de Microbiología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia
Universidad Nacional de Tucumán, Argentina

³Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), ANLIS “Carlos Malbrán”
Argentina

RESUMEN. *Vibrio cholerae* reside habitualmente en aguas marinas y continentales. Según las condiciones ambientales y los recursos le sean “favorables” o “desfavorables”, se generan estados viables cultivables (VC) o viables no cultivables (VNC) respectivamente y, bajo esta última forma sobrevive. Para abordar la problemática del cólera en la Cuenca del Río Salí (Tucumán, Argentina), se realizaron muestreos durante los años 2003-2005 donde se consideraron aspectos físicos, químicos, biológicos y sanitarios. Para evaluar los probables reservorios del patógeno, se analizó el zooplancton del Río Salí (Canal Norte y Banda Río Salí) y Río Lules. La mayor representatividad taxonómica la registraron los copépodos, especialmente *Eucyclops neumani* (Pesta, 1927), junto a *Acanthocyclops robustus* (Sars, 1863), *Metacyclops* sp., *Paracyclops chiltoni* y *Notodiaptomus incompositus* (Brian, 1925), además de algunos rotíferos y cladóceros como (*Lecane* sp.), y (*Brachionus* sp., *Moina* sp. y *Leydigia* sp.). La frecuencia de ocurrencia fue baja y no superó el 25%. El Canal Norte fue ambiente más propicio por la riqueza específica, abundancia y constancia de la comunidad. Las variables físicas y químicas asociadas al zooplancton coincidirían con los valores que por nuestros registros y los antecedentes, se conocen para el desarrollo del patógeno. En el período estival hubo coincidencia entre la presencia de la forma VNC de *V. cholerae* O1 (inmunofluorescencia con anticuerpos anti O1) y el desarrollo del zooplancton. Se observaron formas VNC sobre apéndices o estructuras de copépodos ciclopoideos y cladóceros quidóridos, reflejando probablemente afinidad con sustratos quitinosos.

Palabras clave: microcrustáceos, reservorios, *Vibrio cholerae*, ríos, Tucumán, Argentina.

Microcrustaceans and viable but nonculturable (VNC) *Vibrio cholerae* O1: results in the Salí River basin, Tucumán, Argentina

ABSTRACT. *Vibrio cholerae* habitually lives in marine and continental waters. According to "favourable" or "unfavourable" resources and environmental conditions, viable (VC) or viable non-culturable (VNC) states will be generated, surviving only the latter form. To address the problem of cholera in the Salí River Basin (Tucumán Argentina), samples were taken during the years 2003 to 2005, taking into consideration physico-chemical, biological and sanitary aspects. To infer about the probable reservoirs of the pathogen, we examined the zooplankton of the Salí River ("Canal Norte" and "Banda Río Salí") and Lules River. The highest taxonomic representation was recorded for copepods, especially *Eucyclops neumani* (Pesta, 1927), along with *Acanthocyclops robustus* (Sars, 1863), *Metacyclops* sp., *Paracyclops chiltoni* and *Notodiaptomus incompositus* (Brian, 1925), plus some rotifers and cladocerans such as *Lecane* sp. and *Brachionus* sp., *Moina* sp. and *Leydigia* sp. The occurrence frequency was low, not exceeding 25%. Canal Norte stood out as the best environment for the species richness, abundance and constancy of the community. The physicochemical variables associated with the zooplankton would coincide with the values that, for our records and previous reports, are known for the development of the pathogen. In summer periods there was coincidence between the presence of the VNC form of *V. cholerae* O1 (immunofluorescence with antibodies anti O1) and the

development of zooplankton. VNC forms on cyclopoid copepods and chironomid cladoceran appendages or structures were observed, probably showing an affinity with chitin substrates.

Keywords: microcrustacean, reservoirs, *Vibrio cholerae*, rivers, Tucumán, Argentina.

Corresponding author: Cecilia Locascio (clocascio@webmail.unt.edu.ar)

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae reside habitualmente en aguas marinas y continentales, encontrando condiciones favorables en aguas con niveles moderados de salinidad (Gómez-Gil *et al.*, 2004), alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas, pH neutro o ligeramente alcalino, presencia de macrófitas acuáticas, plancton, peces, moluscos y crustáceos (Jiang, 2001; Huq *et al.*, 2005). Bajo estas condiciones este vibrio puede estar presente como miembro autóctono. Este microorganismo también es capaz de colonizar ecosistemas de agua dulce si encuentra sustratos orgánicos o inorgánicos que favorezcan su supervivencia (Boroto, 1998).

Las actuales áreas de endemismos del cólera son India y varios países de África y América Latina (Colwell, 1996; PAHO, 2008). En el continente americano se registraron entre 1991 y 2004 alrededor de 1,2 millones de casos de cólera con 12.000 muertes, que correspondieron a la séptima pandemia, demostrando el riesgo de mortalidad que existe durante los brotes epidémicos (Martinelli Filho, 2007). En Argentina, las epidemias reaparecieron en 1992 después de 100 años, conociéndose siete brotes epidémicos hasta el presente (Binsztein *et al.*, 2004).

En la provincia de Tucumán, se registraron casos esporádicos (40) de enfermos por *V. cholerae* O1 entre 1992 y 1999 con un comportamiento epidemiológico atípico, ya que la mayor parte de los casos afectaron a niños menores de 5 años (Binsztein, 2000). Estos casos provienen de asentamientos en las riberas de los ríos Lules y Salí. Las poblaciones marginales que habitan esas zonas presentan condiciones socio-ambientales con baja "calidad de vida", viviendas precarias, basurales, falta de servicios públicos (luz, agua, transporte, entre otros), alta proporción de analfabetismo, desocupación y situaciones sanitarias límites (Caria *et al.*, 2006).

Las condiciones ambientales adversas permiten que *V. cholerae* O1 pueda sobrevivir en forma latente como estado viable no cultivable (VNC), reteniendo su actividad metabólica y respiratoria, pudiendo causar enfermedades y siendo incapaz de crecer en medios de cultivos convencionales (Colwell & Grimes, 2000; Binsztein *et al.*, 2004). En períodos de

stress, estas formas VNC se adhieren a organismos para usarlos como reservorios. En tal sentido, los estudios realizados hasta el presente demostraron que algunos artrópodos (crustáceos e insectos) constituyen el grupo más importante de invertebrados que ocupa esta función. Se comprobó que la quitina, el segundo biopolímero más común en el mundo y el primero más abundante en ambientes acuáticos (Meibom *et al.*, 2004; Bartlett & Azam, 2005), que forma el exoesqueleto de artrópodos, constituye un sustrato apropiado para la adhesión de *V. cholerae*. El fito y zooplancton, macroalgas y zoobentos son algunos de los sustratos vivos conocidos, a los que se asocia en los ambientes acuáticos (Nalin, 1976; Tamplin *et al.*, 1990).

Existen distintos aportes que explican la interacción bacteria-reservorio; los primeros trabajos que se conocen sobre esta relación se publicaron en la década del 70' (Sumidu *et al.*, 1971). Se conoce por ejemplo, que *V. cholerae* se asocia con copépodos planctónicos, que tendrían particular importancia como intermediarios en el ciclo biológico (Colwell & Spira, 1992). Al respecto, Boroto (1997) menciona que la adhesión del microorganismo a la quitina le otorga mayor resistencia a la acidez del medio y a las bajas temperaturas. Recientemente, Martinelli Filho (2007), sugiere la existencia de comensalismo, donde el vibrio se favorece por el sustrato quitinoso donde extrae nutrientes (quitinasa), sin causar efectos delétereos en su huésped. Otros autores proponen la asociación de vibrios en una relación simbiótica con organismos provistos de quitina (Leyton & Riquelme, 2008).

La finalidad del presente trabajo consiste en comunicar los resultados del análisis de muestras de los ríos Salí y Lules, y establecer la función de los microcrustáceos presentes como probables reservorios de *V. cholerae* O1 en su forma VNC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios y frecuencia de los muestreos

Entre los años 2003 y 2005 se realizaron 18 campañas que comprendieron seis muestreos de agua por año para análisis bacteriológico en tres sitios determinados

de la Cuenca Salí: dos en el río Salí (Canal Norte y Banda) y uno en el río Lules. Simultáneamente, se obtuvo un total de 54 muestras de plancton para estudiar el zooplancton y la presencia de *V. cholerae* O1 VNC.

Las estaciones de muestreo (Fig. 1) se ubicaron en el río Salí (Canal Norte: 26°47'26"S, 65°09'40"W y Banda Río Salí: 26°50'39"S, 65°10'73"W) a 427 m sobre el nivel del mar (s.n.m.) y río Lules (26°55'15"S 65°19'46"W) a 409 m s.n.m. que forman parte de la región superior de la Cuenca Salí-Dulce.

Variables físicas y químicas

En correspondencia con la toma de muestras, se determinaron algunas variables físicas y químicas del agua como pH, temperatura y conductividad eléctrica con instrumental digital ALTRONIX (Termo – pHmetro TPA-1, Termo-conductímetro CT-1). El oxígeno disuelto (OD) se midió en laboratorio de acuerdo a lo propuesto por APHA (1992) (Tabla 1).

Análisis de zooplancton

Las muestras para el análisis de zooplancton se colectaron con redes cónicas convencionales de 50 µm de abertura de malla, se realizó el arrastre y filtrado superficial del agua durante 15 min. Las muestras fueron obtenidas entre las 08:00 y 12:00 h y fijadas con formaldehído al 4%.

La determinación de los taxa se realizó bajo microscopio óptico y lupa binocular. Para cuantificar las posibles asociaciones entre los microcrustáceos y *V. cholerae* se usó el programa estadístico SPSS 9.0 para Windows.

Detección de *Vibrio cholerae* O1 (VNC)

Se tomaron muestras para estudiar la presencia de *V. cholerae* O1 (DFA-DVC) por inmunofluorescencia directa filtrando 2 L de agua a través de una membrana de 0,22 µm. Se tomó 1 mL de la muestra, tratándola con 100 µL de ANY (extracto de levadura 0,025% y ácido nalidíxico 0,002%), incubándola durante 6 a 8 h a 37°C. Bajo esas condiciones, el *Vibrio* (VNC) pasó de una forma cocoide a una forma más elongada, la bacteria no se multiplicó debido al efecto inhibitorio del ácido nalidíxico. Posteriormente, las muestras se fijaron con formaldehído al 4%.

La detección de *V. cholerae* O1 VNC, se realizó mediante kits de Anticuerpos de Fluorescencia Directa (New Horizons Diagnostics Corporation) y técnica de Conteo Viable Directo DFA-DVC. Para ello se homogeneizó la muestra y se colocó sobre un portaobjeto 5 µL de la misma, se dejó secar al aire y se fijó con 5 µL de etanol absoluto. Se agregó 8 µL de

anticuerpos monoclonales anti-O1, conjugado con isotiocianato de fluoresceína y se incubó en cámara húmeda durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se enjuagó la muestra con PBS (Buffer fosfato pH 7,2) y se secó con la ayuda de papel absorbente. Al material tratado se le agregó una gota de medio de montaje. Luego, mediante un barrido de todo el preparado, se observó con microscopio de epifluorescencia con aumento de 1000X a una longitud de onda de 490 (excitación máxima) y 520 (emisión máxima) con filtro azul. Todos los pasos se realizaron al abrigo de la luz, con controles positivos y negativos provistos en el kit diagnóstico. Las lecturas se realizaron dentro de las 24 h de efectuados los preparados, registrándose el número de bacilos fluorescentes por ejemplar. De las muestras de agua con fluorescencia positiva, se separaron ejemplares de microcrustáceos completos o seccionados (apéndices u otras estructuras morfológicas) que luego fueron lavados con agua destilada. Las preparaciones microscópicas obtenidas (Fig. 2.), fueron procesadas según la técnica descrita (Huq *et al.*, 1990).

La interpretación de los distintos grados de positividad del *Vibrio* en las muestras de agua, fito y zooplancton se hizo considerando el número de bacterias fluorescentes por extendido: (+) de 1 a 10, (++) más de 10 y menos de 30 y, (+++) más de 30.

Cuando en las muestras de agua de un determinado sitio dio inmunofluorescencia directa positiva para *V. cholerae* O1, se buscó en la muestra paralela recogida para zooplancton *V. cholerae* O1 VNC asociada al mismo.

RESULTADOS

Las estaciones de muestreo analizadas estaban en el área de captación, conducción y uso de la cuenca del río Salí, donde existe una fuerte presión antrópica, generada por asentamientos ubicados sobre el lecho de inundación del río, con vertidos contaminantes de origen industrial, principalmente citrícolas y azucareros, líquidos cloacales sin tratamiento y residuos sólidos urbanos, entre otros (Caria *et al.*, 2006). Debido al régimen pluviométrico de tipo monzónico, torrencial y estacional, el ciclo hidrológico presentó un período lluvioso (verano-otoño) y un período seco (invierno-primavera), que se manifiesta claramente en la fluctuación del caudal de estos ambientes lóticos.

Las principales características observadas en cada una de ellas son:

Estación 1, Río Salí-Canal Norte (Fig. 3): cauce del río con una profundidad aproximada entre 0,10 y 0,60 m. Sin transparencia en el agua, de color

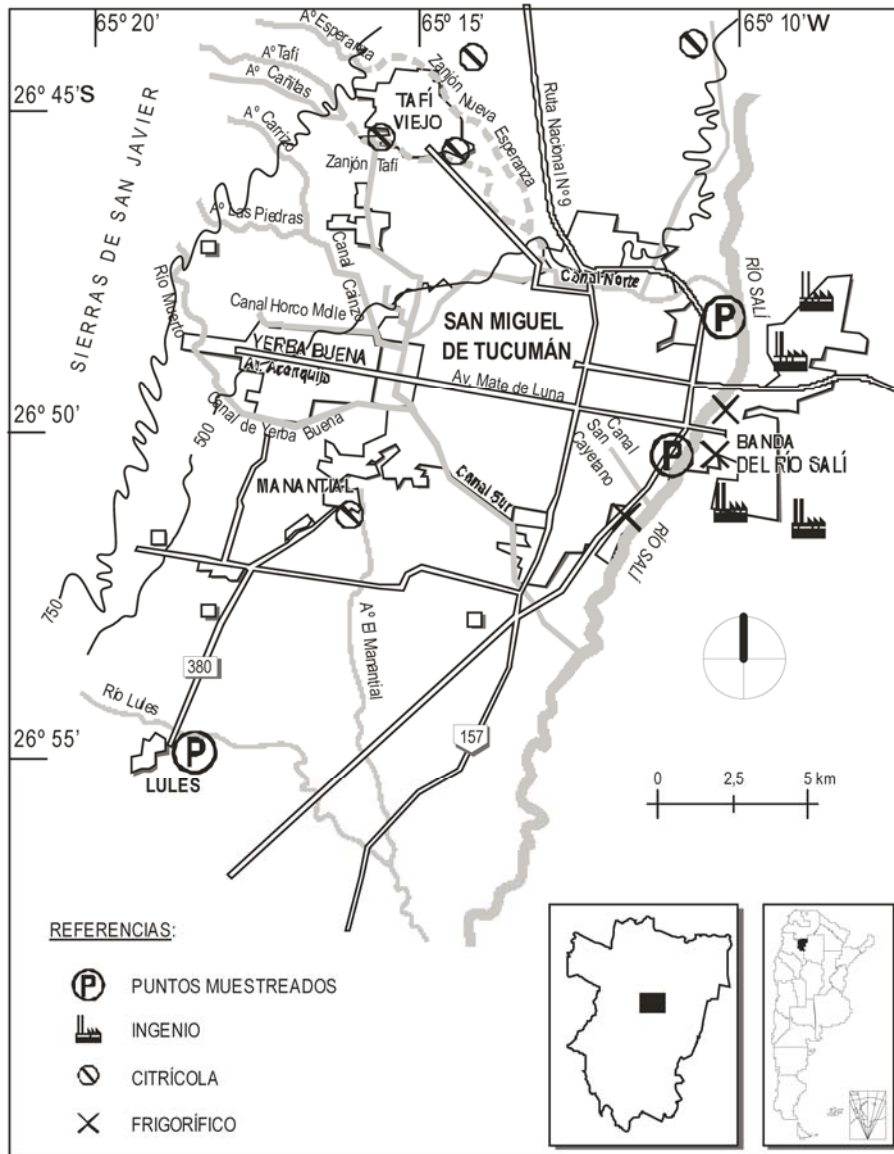


Figura 1. Estaciones de muestreos en los ríos Salí y Lules, Provincia de Tucumán, Argentina.

Figure 1. Sampling stations in Salí and Lules rivers, Tucumán Province, Argentina.

amarillo, pardo o verdoso, con presencia frecuente de espuma, olor desagradable, abundante materia orgánica en suspensión, pH entre 4,52 (Nov 2004) y 8,48 (Dic 2003) y conductividad eléctrica entre 559 $\mu\text{s cm}^{-1}$ (Oct 2003) y 1311 $\mu\text{s cm}^{-1}$ (Abr 2005). El oxígeno disuelto fluctuó entre 0 mg L^{-1} (Abr 2005) y 9 mg L^{-1} (Oct – Dic 2003).

Estación 2, Río Salí-Banda del Río Salí (Fig. 4): cauce del río con una profundidad entre 0,20 y 0,80 m. El agua presentó una coloración parda, con escasa o nula transparencia, con abundante espuma en algunos meses muestreados y olor desagradable. El pH varió

entre 4,47 (Nov 2004) y 8,14 (Dic 2003) y la conductividad eléctrica entre 1000 $\mu\text{s cm}^{-1}$ (May 2004) y 2060 $\mu\text{s cm}^{-1}$ (Mar 2005). Durante gran parte del año el contenido de oxígeno fue bajo o nulo (0 mg L^{-1} : Set 2003 y 2004, Jul 2004, Jun 2005, y 9 mg L^{-1} : Dic 2003).

Estación 3, Río Lules (Fig. 5): cauce del río con una profundidad que varió entre 0,05 y 0,80 m. Agua transparente, con espuma en algunas épocas, escasa materia orgánica suspendida, sin olor. El pH varió entre 4,6 (Nov 2004) y 9 (Feb 2005) y la conductividad entre 1000 $\mu\text{s cm}^{-1}$ (May 2004) y 2060 $\mu\text{s cm}^{-1}$

Table 1. Características físicas y químicas de los sitios de muestreo (años 2003-2005).
Table 1. Physical and chemical characteristics of the sites of sampling (years 2003-2005).

| Fechas (mes/año) | 07/03 | 08/03 | 09/03 | 10/03 | 11/03 | 12/03 | 01/04 | 03/04 | 05/04 | 07/04 | 09/04 | 11/04 | 01/05 | 02/05 | 03/05 | 04/05 | 05/05 | 06/05 | |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| CANAL NORTE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T° del agua | 19,2 | 14,6 | 11,5 | 20,5 | 24 | 26 | 23 | 25 | 15 | 19 | 15 | 19 | 25 | 25 | 22 | 20,5 | 14 | 16 | |
| pH | 7,13 | 5,14 | 4,72 | 8,12 | 8,34 | 8,48 | 7,68 | 7,78 | 7,44 | 5,6 | 4,6 | 4,52 | 8,2 | 8,01 | 7,62 | 7,04 | 7,78 | 6,59 | |
| OD (mg L ⁻¹) | - | - | 4,9 | 9 | 9 | 9 | 5,7 | 4,3 | 1,7 | 0,48 | - | 7,8 | 9 | 3,7 | 3,3 | 0 | 0,7 | 2,8 | |
| Conductividad (µs cm ⁻¹) | 890 | 870 | 902 | 559 | 924 | 938 | 872 | 858 | 736 | 1135 | 1080 | 778 | 850 | 1013 | - | 1311 | 988 | 1059 | |
| BANDA RIO SALI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T° del agua | 25 | 22 | 20 | 21 | 23 | 25 | 25 | 26 | 17 | 20 | 26 | 19 | 22 | 23 | 25 | 21,5 | 15 | 16 | |
| pH | 6,93 | 6,66 | 6,65 | 7,7 | 8 | 8,14 | 7,5 | 7,6 | 7,8 | 6,93 | 4,7 | 4,47 | 8 | 7,93 | 7,7 | 7,69 | 8,08 | 7,9 | |
| OD (mg L ⁻¹) | - | - | 0 | 2,35 | 7,5 | 9 | 4,1 | 6,4 | 8,4 | 0 | 0 | 7,2 | 8,6 | 6 | 4,5 | 0,4 | 4,2 | 0 | |
| Conductividad (µs cm ⁻¹) | 1374 | 1312 | 1329 | 1215 | 1124 | 1093 | 1504 | 1430 | 1000 | 1410 | 1280 | 1040 | 1153 | 1318 | 2060 | 1634 | 1318 | - | |
| RÍO LULES | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T° del agua | 16,6 | 10,3 | 8 | 25 | 25 | 25 | 26 | 26 | 12 | 14,2 | 11,5 | 20 | 26 | 22 | 21,5 | 19,5 | 14,5 | 14 | |
| pH | 7,86 | 8,04 | 8,38 | 8,68 | 7,7 | 8,46 | 8,5 | 8,44 | 8,1 | 8,16 | 4,72 | 4,57 | 8,4 | 9,06 | 8,32 | 8,19 | 8,7 | 6,59 | |
| OD (mg L ⁻¹) | - | - | 9 | 9 | 3,7 | 8,7 | 8,8 | 8,9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 8,4 | 8,1 | 8,7 | 9 | 8 | 9 | |
| Conductividad (µs cm ⁻¹) | 612 | 622 | 650 | 619 | 649 | 658 | 460 | 426 | 400 | 574 | 630 | 516 | 741 | 403 | 349 | 339 | 441 | 549 | |

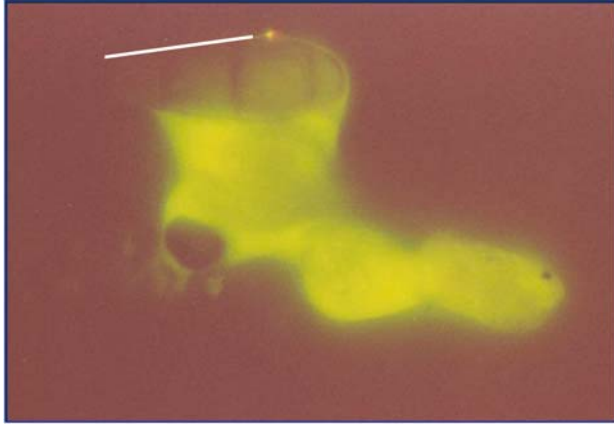


Figura 2. Fotomicrografía de *Vibrio cholerae* O1 (VNC) asociado a rama furcal de copépodo.

Figure 2. Photomicrography of *Vibrio cholerae* O1 (VNC) associated with branch furcal of copepod.

(Mar 2005). El oxígeno varió entre 8,1 y 9,0 mg L⁻¹ durante el período de estudio, a excepción de Nov 2003 donde se registró un valor de 3,7 mg L⁻¹.

La taxocenosis de microcrustáceos se registró en 17 de las 54 muestras recolectadas, presentando siempre escasa abundancia. El Canal Norte se destacó como el ambiente más propicio para su desarrollo, con una frecuencia de ocurrencia de 50%, mientras que en Banda río Salí y río Lules se registraron valores de 28% y 17%, respectivamente. En el río Salí, en condiciones de pH ácido, los microcrustáceos estuvieron ausentes.

Se determinaron tres especies de cladóceros y cinco especies de copépodos. La riqueza específica fue baja no superando las cinco especies por muestreo, valor sólo registrado en Ene 2004 para el Canal Norte. Los meses críticos fueron julio, agosto y setiembre, coincidentes con la zafra azucarera y actividad industrial donde el censo determinó ausencia total de estos organismos.

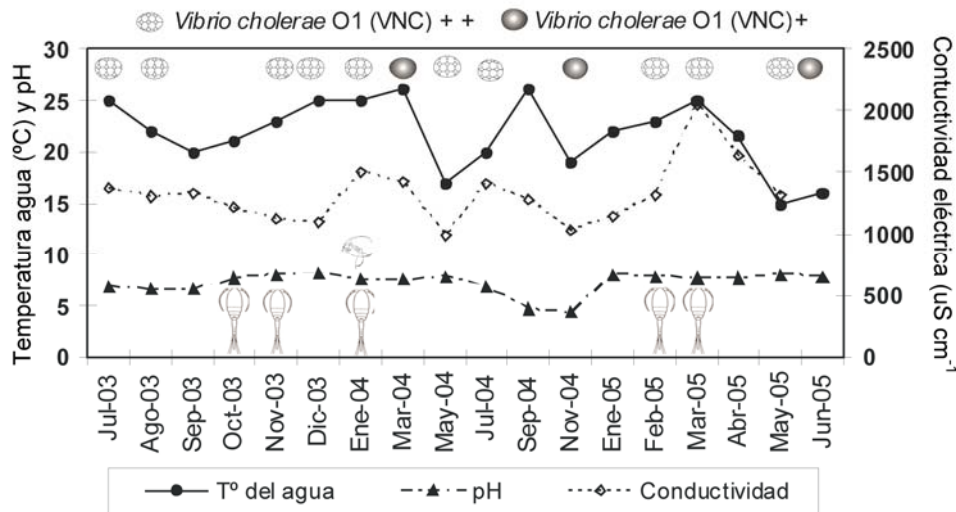


Figura 3. Río Salí (Canal Norte). Positividad de *V. cholerae* O1, presencia de microcrustáceos y variables físicas y químicas. (+) baja positividad, (++) alta positividad.

Figure 3. Salí River (North Channel). Positivity of *V. cholerae* O1 (VNC), presence of microcrustacean and physical and chemical variables. (+) low positivity, (++) high positivity.

Los cladóceros, con registros muy escasos, estuvieron representados con mayor abundancia relativa por *Moina* sp. y por quidóridos como *Alona* sp. y *Leydigia ciliata* Gauthier, 1939.

Los copépodos fueron los más representativos por su riqueza, frecuencia de ocurrencia, abundancia y biomasa. Se identificaron cuatro especies de ciclopoideos: *Acanthocyclops robustus* (Sars, 1863), *Eucy-*

clops neumani (Pesta, 1927), *Metacyclops* sp., *Paracyclops chiltoni* (Thomson, 1882), y una especie de calanoídeo, *Notodiptomus incompositus* (Brian, 1925). *E. neumani* se registró en las tres estaciones de muestreo, con frecuencias de ocurrencia de 17% a 25%. *E. neumani* vive en ambientes lóticos, zonas litorales de lagos, ligado a la vegetación. *N. incompositus* fue la más representativa en el Canal Norte

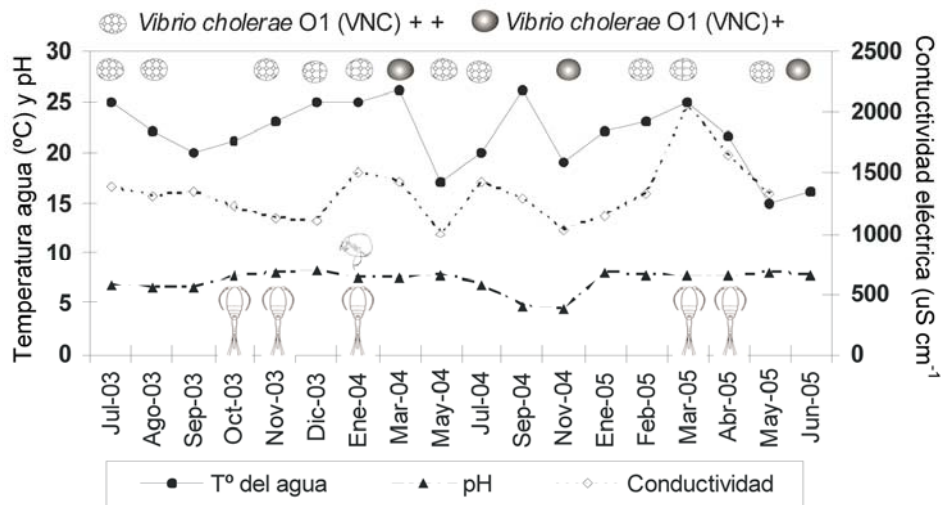


Figura 4. Río Salí (Canal Norte). Positividad de *V. cholerae* O1, presencia de microcrustáceos y variables físicas y químicas. (+) baja positividad, (++) alta positividad.

Figure 4. Salí River (North Channel). Positivity of *V. cholerae* O1 (VNC), presence of microcrustacean and physical and chemical variables. (+) low positivity, (++) high positivity.

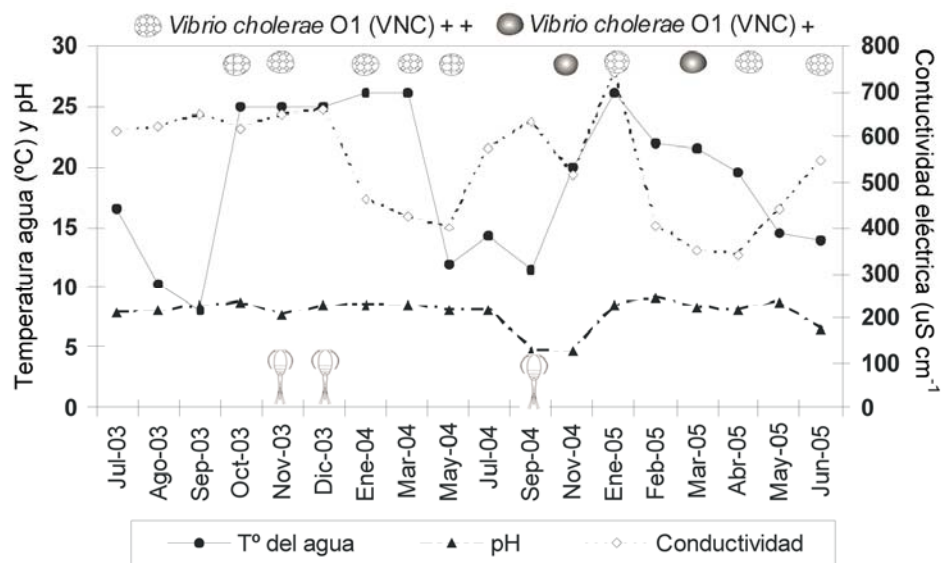


Figura 5. Río Salí (Canal Norte). Positividad de *V. cholerae* O1, presencia de microcrustáceos y variables físicas y químicas. (+) baja positividad, (++) alta positividad.

Figure 5. Salí River (North Channel). Positivity of *V. cholerae* O1 (VNC), presence of microcrustacean and physical and chemical variables. (+) low positivity, (++) high positivity.

(33%), es endémica de la región Neotropical, capaz de colonizar distintos ambientes acuáticos, y vive en ríos, lagos de valle de inundación, lagunas y embalses. Es una forma micrófaga, tolera aguas con pH de 6-9,5 y salinidad de 0,6-9,5 g L⁻¹ (Ringuelet, 1958). Estas especies son eurioicas, tolerantes a un amplio rango de

variación de las características físicas y químicas de los ambientes.

La aplicación de los índices de correlación de Spearman, Distancia Euclidiana y de coincidencia de Dice no expresaron valores significativos, infiriendo falta de asociación entre el patógeno y los micro-

crustáceos para este período de estudio (n: 54) (Krebs, 1989).

DISCUSIÓN

El fitoplancton y zooplancton son comunidades acuáticas particularmente importantes como microhábitats de *V. cholerae*, ya que proveen de protección en períodos interepidémicos (Islam *et al.*, 2007).

Se ha demostrado una correlación directa entre las abundancias de zooplancton y los casos de cólera (Huq *et al.*, 2005). El descubrimiento de una proteína mediadora de la asociación de la bacteria, que se asocia a un azúcar, presente tanto en células epiteliales del zooplancton como en el intestino humano, refuerza la hipótesis de que la ingesta de zooplancton puede ser la causa del surgimiento de epidemias (Kirm *et al.*, 2005).

La condición de presentar un exoesqueleto quitinoso sería la causa fundamental de esta afinidad entre *V. cholerae* y microcrustáceos zooplanctónicos, al suministrar un sustrato en organismos vivos e inclusive en exuvias.

Las características intrínsecas de las poblaciones de cladóceros y copépodos tales como las formas de vida (limnéticas o bentónicas), las abundancias relativas tanto de las formas inmaduras como las de los adultos, así como la dinámica espacio-temporal de las poblaciones, determinarían la variabilidad en la eficacia de dispersión y colonización del patógeno (Rawlings *et al.*, 2007). La escasa presencia y abundancia de microcrustáceos en las muestras estudiadas, no permitió reafirmar la función efectiva del zooplancton como reservorio de *V. cholerae*.

Las características ecológicas particulares de los sitios estudiados (flujo del agua, escasa profundidad, variación del pH, alta saprobiedad, bajo tenor de OD, vertidos industriales y agroquímicos, etc.), indudablemente serían los factores que estarían impactando en la comunidad. Los valores muy bajos de transparencia de estos ambientes, con una cantidad elevada de materia en suspensión, constituirían otro factor de inhibición en el desarrollo de los microcrustáceos. Esto concuerda con la conocida relación negativa entre la abundancia de crustáceos y la concentración de partículas en suspensión en el río Paraná (José de Paggi, 1994). Esta sería la razón por la que se encontraron especímenes más asociados al fondo (cladóceros quidóridos y algunos copépodos ciclopoideos). Además, existirían aspectos relacionados a la demografía de las poblaciones que reflejarían la baja adecuación biológica, como la escasez de hembras ovígeras de copépodos, con pocos huevos (epifluores-

cencia negativa en preparados de los sacos con huevos) y escasa abundancia, especialmente de cladóceros.

Desde el punto de vista taxonómico, se corroboró la relevancia de copépodos *versus* cladóceros, ya que expresaron mayor frecuencia de ocurrencia total y abundancia.

Considerando las múltiples estrategias de vida de *V. cholerae* sería importante continuar estudiando el zooplancton (mayor tamaño de muestra?) y otros organismos alternativos que podrían cumplir la función de reservorios (Halpern *et al.*, 2004). En tal sentido, se debe destacar que en las muestras estudiadas, se encontraron otros invertebrados que presentan estructuras quitinosas, como: Collembola, Odonata Zygoptera, Ephemeroptera Baetidae y Caenidae, Plecoptera, Hemiptera Bellostomidae, Coleoptera Hydrophilidae y Diptera (formas inmaduras en 55% de las muestras). Este último orden de insectos, estuvo representado al menos por siete familias (Chironomidae, Culicidae, Dolichopodidae, Psychodidae, Syrphidae, Sciaridae, Ceratopogonidae), con una frecuencia total de 44% para Chironomidae y de 20% para Culicidae.

De los resultados obtenidos surge también, la necesidad de implementar monitoreos de la Cuenca Salí-Dulce, ya que no existen antecedentes sobre el tema. De esta manera, se podrían comprender las múltiples interacciones entre el *V. cholerae* y la biota coexistente así como Leyton & Riquelme (2008) lo expresan para este y otros vibriones en los ecosistemas costeros.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo subsidiado por PICTR2000-00010 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Cultura y Educación, Argentina.

REFERENCIAS

- Bartlett, D.H. & F. Azam. 2005. Chitin, cholera and competence. *Science*, 310: 1775-1777.
- Binsztein, N. 2000. Cólera: reservorios, vías de transmisión y caracterización de nuevos factores de virulencia de *Vibrio cholerae*. Proyecto PICTR2000-00010. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Secretaría de Ciencia y Tecnología (ANPCYT), Ministerio de Cultura y Educación, Argentina 2.5: 7.
- Binsztein, N., M. Costagliola, M. Pichel, V. Jurquiza, F. Ramírez, R. Akselman, M. Vacchino, A. Huq & R.

- Colwell. 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12): 7481-7486.
- Borroto, R.J. 1997. La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 en ambientes acuáticos. *Rev. Panam. Salud Pública*, 1(1): 3-8.
- Borroto, R.J. 1998. Supervivencia de *Vibrio cholerae* en aguas dulces superficiales y cólera endémico: una hipótesis geocológica. *Rev. Panam. Salud Pública*, 4: 371-374.
- Caria, M., E. Reverso, E. Zain El Din. 2006. Problemáticas socio-ambientales en las márgenes del río Salí en el tramo medio del Gran San Miguel de Tucumán. En: A. Aquino, M. Collantes & R. Mon. (eds.). *Desafíos ambientales del Gran San Miguel de Tucumán, Argentina*. Editorial Magna, 3: 43-56.
- Colwell, R.R. & W.M. Spira. 1992. The ecology of *V. cholerae*. In: D. Barua & W.B. Greenough III (eds.). *Cholera*. Plenum Medical Book, New York, pp. 107-127.
- Colwell, R. 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*, 274: 2025-2031.
- Colwell, R.R. & J. Grimes. 2000. Semantics and strategies. In: R.R. Colwell & J. Grimes (eds.). *Non-culturable microorganisms in the environment*. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, pp. 1-6.
- Gómez-Gil, B., F.L. Thompson, C.C. Thompson, A. García-Gasca, A. Roque & J. Swings. 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 261-265.
- Halpern, M., Y.B. Broza, S. Mittler, E. Arakawa & M. Broza. 2004. Chironomid egg masses as a natural reservoir of *Vibrio cholerae* Non-O1 and Non-O139 in freshwater habitats. *Microb. Ecol.*, 47: 341-349.
- Huq, A., R. Colwell, R. Rahman, A. Ali, M.A.R. Chowdhury, S. Parven, D.A. Sack & E. Russek-Cohen. 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(8): 2370-2373.
- Huq, A., R.B. Sack, A. Nizam, I.M. Longini, G.B. Nair, A. Ali, J.G. Morris, Jr., M. N. Khan, A.K. Siddique, M. Yunus, M.J. Albert, D.A. Sack & R. Colwell. 2005. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8): 4645-4654.
- Islam, M.S., M.I.K. Jahid, M.M. Rahman, M.Z. Rahman, M.S. Islam, M.S. Kabir, D.A. Sack & G.K. Schoolnik. 2007. Biofilm acts a microenvironment for plankton-associated *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Bangladesh. *Microbiol. Immunol.*, 51(4): 369-379.
- Jiang, S.C., W. Fu. 2001. Seasonal abundance and distribution of *Vibrio cholerae* in coastal waters quantified by a 16S-23S Intergenic spacer Probe. *Microb. Ecol.*, 42: 540-548.
- José de Paggi, S. 1994. Zooplancton del Río Paraná: microcrustáceos y material inorgánico en suspensión. Tesis de Magister, Universidad Nacional del Litoral, Argentina, 66 pp.
- Krebs, C.J. 1989. *Ecological methodology*. Harper Collins Publishers, New York, 654 pp.
- Kirn, T.J., B.A. Jude & R.K. Taylor. 2005. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature*, 438: 863-866.
- Leyton, Y. & C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 43(3): 441-456.
- Martinelli Filho, J.E. 2007. A associação entre o zooplâncton e *Vibrio cholerae* no complexo estuarino de Santos-Bertioga e Plataforma adjacente. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 134 pp.
- Meibom, K.L., X.B. Li, A.T. Nielsen, C.Y. Wu, S. Roseman, & G.K. Schoolnik. 2004. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am.*, 101(8): 2524-2529.
- Nalin, D. 1976. Cholera, copepods and chitinase. *Lancet*, 2(7992): 958.
- Pan American Health Organization (PAHO). 2008. Number of cholera cases in the Americas (1990-2008). [<http://www.paho.org/english/hcp/hct/eer/cholera.htm>]. Revisado: 15 Julio 2008.
- Rawlings, T.K., G.M. Ruiz & R.R. Colwell. 2007. Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(24): 7926-7933.
- Ringuelet, R. 1958. Primeros datos ecológicos sobre copépodos dulceacuícolas de la República Argentina. *Physis*, 21(60): 14-31.
- Tamplin, M.L., A. Gauzens, A. Huq, D.A. Sack & R.R. Colwell. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6): 1977-1980.
- Simidu, U., K. Ashino & E. Kaneko. 1971. Bacterial flora of phyto- and zooplankton in the inshore water of Japan. *Can. J. Microbiol.*, 17: 1157-1160.

Received: 30 October 2008; Accepted: 22 October 2009

