

INFORME FINAL (Enero - Junio 2013). Estudios bacteriológicos.

Lugar de realización: Lab. de Microbiología General. Dto. de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS.

Personal responsable: Dra. Mónica D. Baldini, Lic. M. Eugenia Streitenberger.

PARTE 1: MONITOREO BACTERIANO EN AGUAS Y SEDIMENTOS DEL ESTUARIO, EN INMEDIACIONES DEL BALNEARIO MALDONADO, Y EN EL EFLUENTE DE LA PLANTA DEPURADORA DE LÍQUIDOS CLOACALES DE LA 3ª CUENCA BAHÍA BLANCA.

1.1 INTRODUCCIÓN

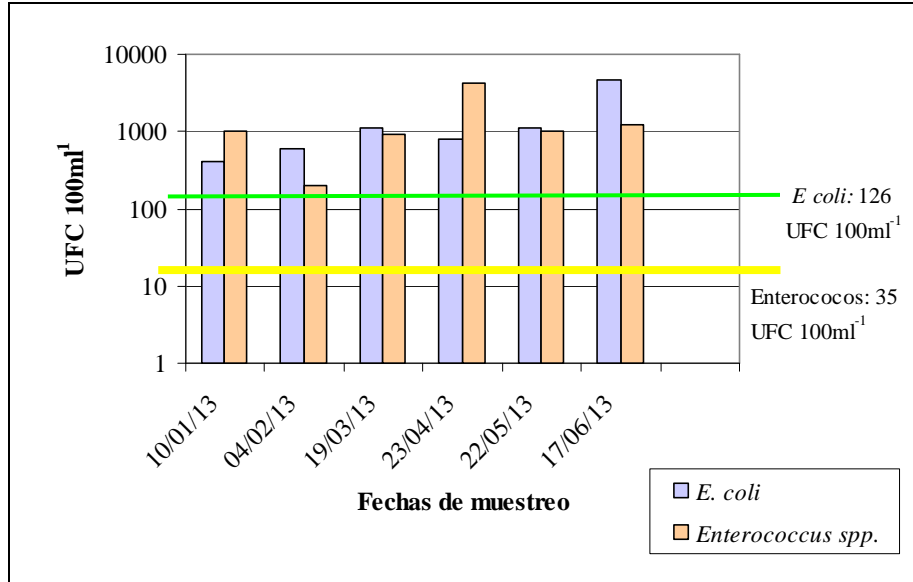
Entre Enero y Junio de 2013 se realizaron muestreos de agua y sedimentos en el área cercana al balneario Maldonado (Puerto Almirante Brown), y de agua en la Planta de tratamiento de líquidos cloacales para la 3º Cuenca (PTLC).

La metodología empleada así como la fundamentación de los grupos fisiológicos bacterianos estudiados, han sido ampliamente descriptas en informes anteriores.

1.2 RESULTADOS

En el área cercana al balneario Maldonado (Figura 1), se observó que los valores de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. en aguas fueron superiores a los exigidos por la normativa nacional e internacional para aguas de contacto primario, que es de ≤ 126 UFC 100ml⁻¹ para *E. coli* y 35 UFC 100 ml⁻¹ para *Enterococcus* spp.(USEPA, 2003), siendo similares a los registrados en estudios previos (Streitenberger y Baldini, 2010; Informe 1º, 2º semestre 2012). En algunas fechas los valores de enterococos fueron superiores a los de *E coli*. Esto podría deberse a una mayor resistencia de este microorganismo para sobrevivir a las condiciones adversas del medio estuarino.

Figura 1: Comparación de los indicadores de contaminación fecal en el área cercana al balneario Maldonado (Puerto Almirante Brown) y los correspondientes límites permitidos para uso recreacional.



Coincidentemente con la bibliografía internacional (Fernandes Cardoso de Oliveira and Watanabe Pinhata, 2008; Badgley et al., 2010), se evidenció la tendencia a la acumulación de las bacterias indicadoras (*E. coli* y *Enterococcus spp.*) en sedimentos (Tabla 1). Esto se debe a que las partículas de sedimentos tienen un efecto protector, prolongando la persistencia de los microorganismos en ellos. Un efecto similar tienen las partículas en suspensión que no sólo actúan como microambientes favoreciendo la supervivencia de las bacterias en el medio, e incluso sustentando un lento crecimiento, sino también como vectores, al permitir el transporte de las células bacterianas hacia los sedimentos (Cabezalí et al., 2004). Esta tendencia ya fue mencionada en el informe previo (Informe 2º semestre 2012).

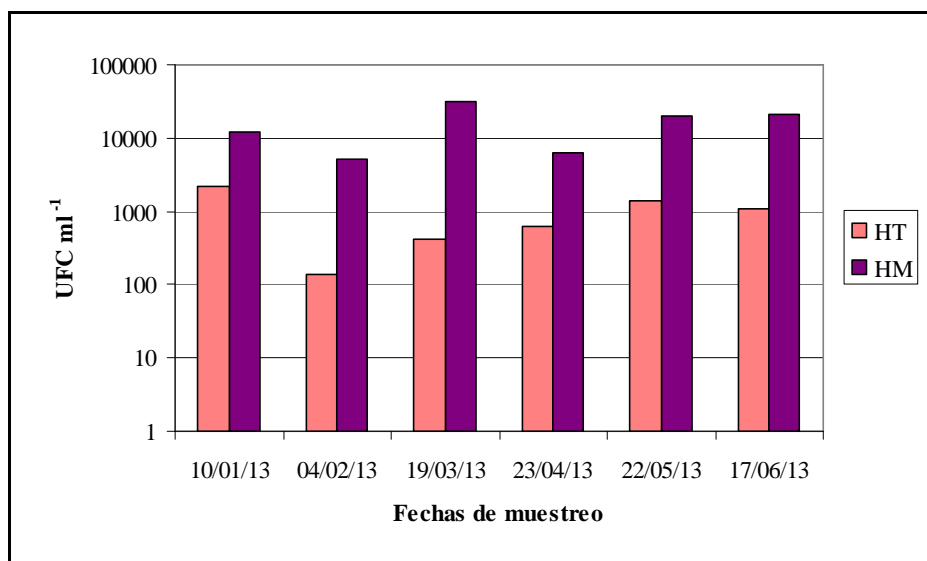
Tabla 1: Recuentos de los indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*) en sedimentos en el área cercana al balneario Maldonado (Puerto Almirante Brown).

Fechas de muestreo	<i>E.coli</i> (UFC g ⁻¹ peso seco)	<i>Enterococcus spp.</i> (UFC g ⁻¹ peso seco)
19-03-13	160	160
17-06-13	120	350

Las comunidades microbianas heterótrofas cumplen un rol importante en los procesos de descomposición, regeneración de nutrientes, recirculación y producción de material particulado así como la relación con otros organismos del ambiente marino (Devanathan et al., 2010).

Los recuentos de bacterias heterótrofas de origen marino (HM) superaron a las terrestres (HT) en todas las fechas de muestreo (Figura 2). Esto es de esperar, ya que estas bacterias son autóctonas, se encuentran en mayor proporción y compiten más exitosamente por los nutrientes. Los valores de HM estuvieron entre 10^3 y 10^4 UFC ml^{-1} , y son similares a los encontrados en otros ambientes costeros (Pucci et al., 2009, Sridevi, 2011).

Figura 2: Recuento de bacterias heterótrofas de origen terrestre (HT) y marino (HM) en el área cercana al balneario Maldonado (Puerto Almirante Brown).



Los recuentos de coliformes fecales en la PTLC (Figura 3) fueron fluctuantes con valores que variaron entre 75 y $1,1 \cdot 10^6$ NMP $100 ml^{-1}$. Los valores que estuvieron por debajo del límite permitido que es de < 2000 NMP $100 ml^{-1}$ (Ministerio de Asuntos Agrarios y Producción, 2003), se corresponden con un correcto funcionamiento de los sistemas de aireación mencionados en el informe de avance (La Nueva Provincia, 2 de Mayo de 2013). Esta misma tendencia se evidenció en los enterococos (Figura 4) con valores entre 100 y $1,1 \cdot 10^6$ UFC $100ml^{-1}$.

Los resultados sugieren que cuando la planta tiene un correcto funcionamiento los valores de los indicadores cumplen con la legislación vigente. Por lo tanto las fluctuaciones registradas en los recuentos bacterianos, guían a pensar que hasta el momento no se logró que la planta entrara en régimen.

Figura 3: Recuento de coliformes fecales (NMP) en aguas de la PTLC 3° Cuenca durante el período muestreado.

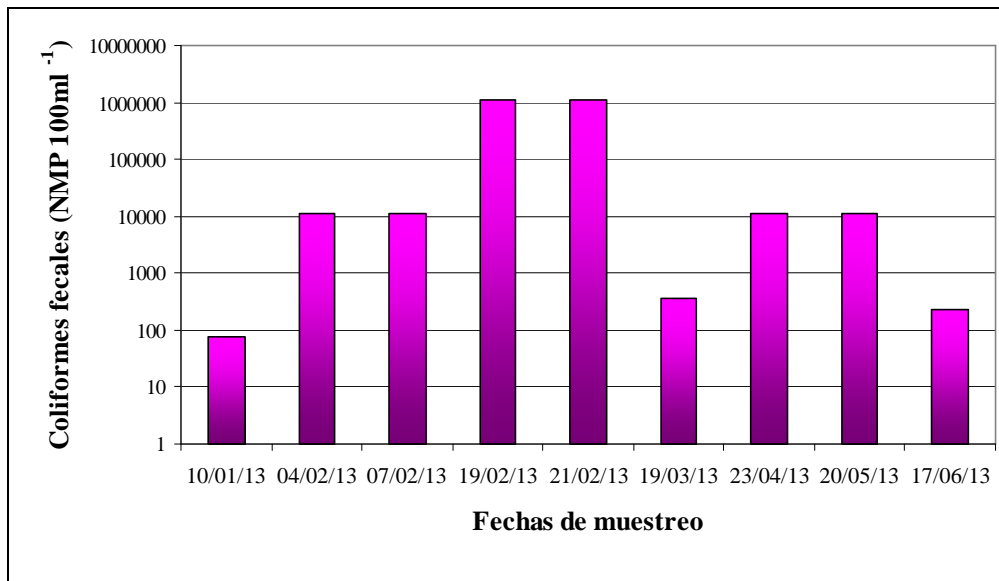
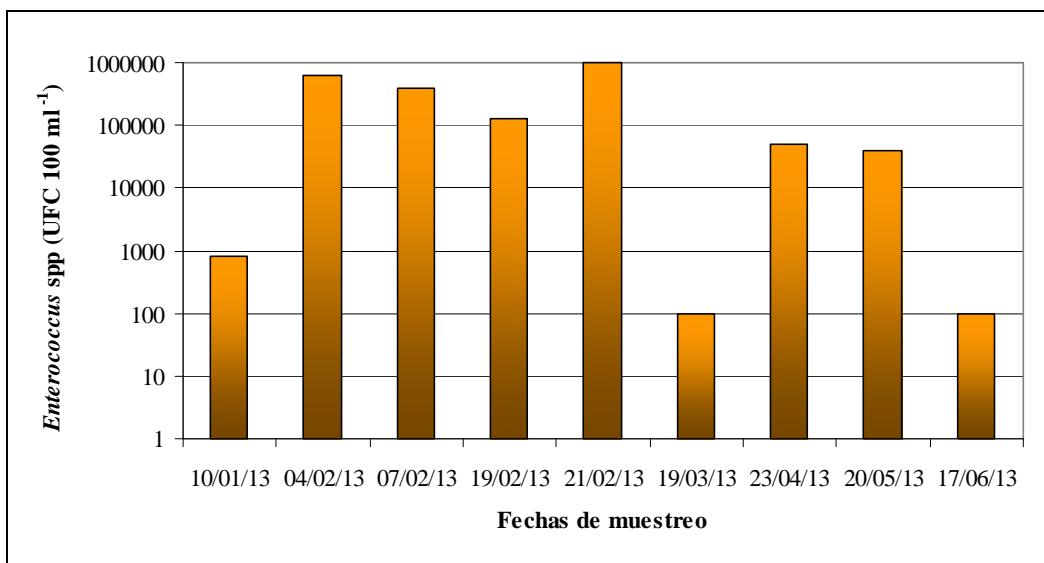


Figura 4: Distribución temporal de *Enterococcus* spp. en aguas de la PTLC 3° Cuenca.



1.3. CONCLUSIONES

Es importante recordar que la zona interna del estuario tiene baja renovabilidad de agua y por lo tanto presenta alta fragilidad. Es preocupante el aumento de los indicadores bacterianos de contaminación fecal en el área cercana al balneario Maldonado. Se cuenta con estudios históricos en esta zona en los que los valores promedio de *E. coli* eran de 50 UFC 100 ml⁻¹ (Cabezalí et al.1995). A partir de la puesta en funcionamiento de la PTLC (2009), los niveles alcanzados fluctuaron entre 100 y 1400 UFC *E. coli* 100ml⁻¹. En el 2010 y 2011 los promedios fueron cercanos a 1000 UFC 100 ml⁻¹ y en el 2012 el recuento promedio de *E. coli* 100ml⁻¹ fue de 1700.

Llaman la atención los resultados de los indicadores de contaminación fecal en aguas, obtenidos en el último muestreo (17/06/2013) y que se presentan en las Figuras 1, 3 y 4. Si bien se utilizan dos métodos de cuantificación distintos (NMP y recuento en placa), en el Puerto Alte. Brown los valores de *E. coli* y enterococos (Figura 1) superan en un orden de magnitud a los recuentos de coliformes fecales y enterococos obtenidos en los efluentes de la PTLC (Figura 3 y 4). Esto hace pensar en la existencia de alguna otra fuente de contaminación fecal que afecta la zona, además de los volcados de la PTLC, y plantea la necesidad de ponerlos en evidencia. Por esto se sugiere, incluir en próximos muestreos el análisis de los afluentes que llegan al estuario (Ej. Canal Maldonado).

El incremento de los recuentos en los últimos años sugiere un paulatino deterioro de la calidad bacteriológica de la zona y alertan sobre el funcionamiento deficiente de la PTLC. Se requiere optimizar el tratamiento de líquidos cloacales, ya que se corre el riesgo de alterar irreversiblemente las condiciones ambientales del estuario, con el consiguiente riesgo sanitario.

La degradación y contaminación de los ecosistemas acuáticos minimiza la potencialidad del uso de sus aguas, llevando a la pérdida de la biodiversidad que estos albergan e incluso en algunos casos, convirtiéndose en un riesgo para la salud de la población.

PARTE 2: Ensayo Microtox

2.1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los ensayos ecotoxicológicos, los efectuados sobre la bacteria marina *Vibrio fischeri* son útiles para *screening* debido a que son rápidos, utilizan poca cantidad de muestra, poseen alta sensibilidad, poder discriminante, reproducibilidad y fácil aplicación para contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Vibrio fischeri* tiene la ventaja de presentar rutas bioquímicas similares a las de los organismos superiores, ciclos de vida cortos y además responden rápidamente a los cambios en el medio ambiente.

Durante los últimos quince años se ha utilizado el bioensayo de toxicidad, distribuido comercialmente como Microtox®. Este examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri*, en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC50).

2.2. ENSAYO REALIZADO EN LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE LÍQUIDOS CLOACALES PARA LA 3° CUENCA.

2.2.1. Resultados

Se analizaron 2 muestras del efluente de la Planta de Tratamiento para la 3° Cuenca.

1. Muestra N°1

- a. Fecha de toma de muestra: 11-01-13
- b. Metodología: se ensayó con el test al 45 %, para muestras con media toxicidad. Se repitió el ensayo a diferentes tiempos de exposición a fin de evaluar el tiempo óptimo.
- c. Resultados Obtenidos:
 - 5 minutos: 11% pérdida
 - 10 minutos: 19 % pérdida
 - 20 minutos: 49 % pérdida

- d. Conclusión: De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que a mayor tiempo de exposición se da una mayor respuesta. Por lo tanto se considera 20 minutos el tiempo óptimo de exposición.

2. Muestra N° 2

- a. Fecha de toma de muestra: 23-04-13
- b. Metodología: se ensayó con el test al 2 %, para muestras con alta toxicidad. Se repitió nuevamente con el test al 45% para muestras con media toxicidad. Se ensayó a diferentes tiempos de exposición a fin de evaluar el tiempo óptimo.
- c. Resultados Obtenidos: Test 2%
- 5 minutos: 3 % pérdida
10 minutos: 3% pérdida
20 minutos: 3% pérdida
- Test al 45%
- 5 minutos: 2 % pérdida
10 minutos: 2% pérdida
20 minutos: 2% pérdida
- d. Conclusión: De acuerdo a los resultados obtenidos, en ambos ensayos y a diferentes tiempos de exposición se encontraron valores muy bajos de toxicidad.

Discusión de los resultados obtenidos:

Teniendo en cuenta que en los casos expuestos se trabajó con el efluente sin diluir, los resultados obtenidos en ambas muestras denotan una baja toxicidad del efluente.

2.3. ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS DESARROLLADOS EN SEDIMENTOS.

Desde el punto de vista ambiental, los sedimentos son uno de las matrices de mayor importancia ecológica dentro de los ecosistemas acuáticos, al jugar un papel relevante en el intercambio de sustancias químicas entre las fases particulada, disuelta y

biológica. Muchos contaminantes son relativamente insolubles en el agua y son adsorbidos por la materia orgánica particulada, la cual eventualmente se asienta en los sedimentos. De esta forma, los sedimentos pueden acumular pulsos de episodios de contaminación, tanto antiguos como recientes, actuando como uno de los mayores depósitos naturales de contaminantes persistentes.

Básicamente hay cuatro métodos de exposición en los tests de toxicidad de sedimentos que definen tres fases operativas distintas. Los métodos descritos son la fase sólida (el sedimento sin alteraciones), la líquida (extractos o el agua intersticial) y un extracto del sedimento (extracción química) (DellValls y Conradi, 2000).

El ensayo Microtox se desarrolló inicialmente para evaluar la toxicidad aguda de muestras de agua y aguas residuales así como para extractos (Latt Phyu et al., 2005; Parvez et al., 2006). Posteriormente este protocolo fue utilizado para la evaluación de la toxicidad de sedimentos mediante la exposición de las bacterias a los lixiviados, al agua intersticial o a extractos con disolventes orgánicos (Ocampo-Duque et al., 2008; Tuikka et al., 2011) y recientemente se ha adaptado como ensayo sobre la fase sólida (VolpiGhirardini et al., 2009). De esta manera, este nuevo protocolo incorpora el contacto directo de las bacterias con las partículas de sedimento, así como con el agua intersticial (Casado- Martinez et al., 2006).

Para poner en marcha el ensayo del Microtox en sedimentos del estuario de Bahía Blanca, se debe contar con sedimentos no contaminados (blanco), esto implica hallar un ambiente costero prístino. En este sentido, se están evaluando muestras de distintas procedencias para ensayo como blanco.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- * Badgley BD, Nayak BS and Harwood VJ. 2010. The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of *enterococci* in a subtropical watershed. *Water Research* 44: 5857- 5866.
- *Cabezali CB, Baldini MD, Cubitto MA, Chiarello MN. 1995. Estudio bacteriológico de aguas marinas para uso recreacional. *Revista Argentina de Microbiología* 27:115-122.
- * Cabezali CB, Baldini MD, Cubitto MA. 2004. Estudios Microbiológicos. Bacterias Indicadoras de Contaminación. En: Piccolo C y Hoffmayer M.

Ecosistemas del estuario de Bahía Blanca: 109-120. EDIUNS. Bahía Blanca. Argentina.

*Casado-Martínez MC, Campisi T, Díaz A, Lo Re R, Obispo R, Postma JF, Riba I, Sneekes AC, Buceta JL, DelValls TA. 2006. Ejercicio interlaboratorio de bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros en España. II. Ensayo de inhibición de la bioluminiscencia para la evaluación rápida de la toxicidad de sedimentos. *Ciencias Marinas* 32: 129–138.

*DelValls TA, Conradi M. 2000. Avances en ecotoxicología marina: Comparación entre tests de laboratorio y estudios *in situ* para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. *Ciencias Marinas* 26:39-64.

*Devanathan K, Srinivasan M, Balakrishnan S. 2010. Studies on the total heterotrophic bacterial population density from Uppanar estuary (Harbour), Cuddalore Coast. *Advances in Biological Research* 4: 139-145.

* Fernandes Cardoso de Oliveira AJ, Watanabe Pinhata JM. 2008. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research* 42: 2242– 2250.

*La Nueva Provincia, 2 de Mayo de 2013.
http://www.lanueva.com/edicion_impresa/nota/12/03/2013/d3c025.html

* Latt Phyu Y, Warneb MSJ, Lima RP. 2005. Effect of river water, sediment and time on the toxicity and bioavailability of molinate to the marine bacterium *Vibrio fischeri* (Microtox). *Water Research* 39: 2738–2746.

*Ministerio de Asuntos Agrarios y Producción. 2003. Resolución ADA N° 336/2003. 8 pp.

*Ocampo-Duque W, Sierra J, Ferré-Huguet N, Schuhmacher M, Domingo JL. 2008. Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 72: 715–721.

*Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S. 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 32: 265 – 268.

- *Pucci GN, Acuña AJ, Llanes ML, Tiedemann MC, Pucci OH. 2009. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44: 49-58.
- *Sridevi M. 2011. Study of heterotrophic bacteria in the surface water of Champayathi estuary (AP) India. *Science Research Reporter* 1: 112-114.
- *Streitenberger ME, Baldini MD. 2010. Deterioro de un área recreacional por efectos del volcado de líquidos cloacales. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 307-310.
- *Tuikka AI, Schmitt C, Oss SH, Bandow N, VonderOhe PC, deZwart D, deDeckere E, Streck G, Mothes S, vanHattum B, Kocan A, Brix R, Brack W, Barcelo D, Sormunen AJ, K.Kukkonen JV. 2011. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:123–131.
- * U. S. Environmental Protection Agency. 2003. Bacterial Water Quality Standards for Recreational Waters (Freshwater and Marine Waters) Status Report. U. S. Environmental Protection Agency publication n. EPA- 823-R-03 -008. Office of Water, Washington, D.C. 29 pp.
- * VolpiGhirardini A, Girardinia M, Marchettoa D, Pantanib C. 2009. Microtox solid phase test: Effect of diluents used in toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 851–861.

Lic. María Eugenia Streitenberger

Dra. Mónica D. Baldini

Bahía Blanca, 2 de julio de 2013