

Para la aplicación del modelo se establecieron dos escenarios futuros, correspondientes a dos horizontes de tiempo: año 2015 (Escenario F1) y año 2030 (Escenario F2); cada uno de ellos caracterizado por el caudal medio anual de vertido. Las concentraciones más significativas se producen hasta una distancia máxima de 60 m desde el punto de vertido, y sobre un ancho del orden de los 20 m. El tramo del riacho Barranqueras en estudio no es apto para los Usos I, II y V. Los Usos III, IV y VI están limitados principalmente por PT y SST en aproximadamente 400 m desde el lugar de descarga.

Estos resultados pueden variar en caso de que se redefinan los valores límites de los parámetros (o, incluso, los parámetros indicadores) en función de análisis basados en consideraciones locales. También pueden variar si cambian las condiciones del efluente. De todos modos, se consideran representativos de las dimensiones esperables para las zonas de uso limitado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Menéndez, A.N., Badano, N.D., Lopolito, M.F., Re, M., (2013). “Water Quality Assessment for a Coastal Zone through Numerical Modeling”. *JAWER – Journal of Applied Water Engineering and Research*, 1:1, August 2013, 8-16, DOI: 10.1080/23249676.2013.827892.

USEPA (1985). *Rates, Constants, and Kinetics Formulations in Surface Water Quality Modeling (Second Edition)*, EPA/600/-85/040.

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS Y DE CIANOBACTERIAS

López Abel ¹, Bazán Raquel ¹, Larrosa Nancy ¹, Montecino Andrea ¹, Sánchez Ana Paula ¹, Benedetti María Julieta ¹, Grión Jeremías ¹, Gaido Claudia ¹, Ruibal Conti Ana Laura ², Ruiz Marcia ², Mengo Luciana ² & Halac Silvana ^{2,3}

¹ Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

² Instituto Nacional del Agua-Centro de la Región Semiárida, Córdoba, Argentina

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina. Av. Vélez Sarsfield 1611 Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina, 351 4333078 - abel.lopez@unc.edu.ar

RESUMEN

El embalse Los Molinos (ELM) es un cuerpo de agua mesotrófico con una marcada tendencia hacia la eutrofia donde periódicamente se registran florecimientos de cianobacterias y presencia de algunos grupos de bacterias patógenas, coliformes termotolerantes (ej., *Escherichia coli*) y *Enterococcus spp.* (STC). Se desconoce si existe alguna interacción entre el crecimiento de las bacterias patógenas del ELM y de cianobacterias, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar esa hipótesis. Se confirmaron mediante pruebas bioquímicas y biología molecular cepas de *E. coli* y *Enterococcus spp.* aisladas del ELM. Las bacterias se inocularon en laboratorio junto con cultivos puros de *Microcystis aeruginosa*. Las condiciones de experimentación fueron medio de cultivo O₂, 25 °C, 3000 lux y fotoperíodo 12:12 h. Se establecieron 3 tratamientos de interacción: 1) *M. aeruginosa* + *E. coli*; 2) *M. aeruginosa* + STC; 3) *M. aeruginosa* + *E. coli* + STC con 3 réplicas cada uno, durante 14 días. En todos los tratamientos los recuentos mostraron que tanto la concentración de *E. coli* como la de STC fue decreciendo en el tiempo, mientras que *M. aeruginosa* creció exponencialmente. La disminución de las poblaciones de ambas cepas de bacterias podría deberse a un mecanismo de inhibición producido por *M. aeruginosa*. Se requieren realizar más estudios para confirmar este efecto inhibitorio.

ABSTRACT

Los Molinos reservoir (LMr) is a mesotrophic water source that shows a pronounced tendency to eutrophication and frequently presents cyanobacterial blooms and occurrence of pathogenic bacteria as thermotolerant coliforms (e.g. *Escherichia coli*) and *Enterococcus spp.* (STC). Since it is not known if some interaction between the LMr's pathogenic bacteria and cyanobacteria growth occurs, the aim of our work was to prove this hypothesis. *E. coli* and *Enterococcus spp.* isolated strains from LMr were confirmed by biochemical tests and molecular biology. Bacteria were inoculated with *Microcystis aeruginosa*'s axenic cultures at a laboratory. The experimental conditions were O₂ culture media, 25°C, 3000 lux and a photoperiod 12:12 h. Three interaction treatments were established: 1) *M. aeruginosa* + *E. coli*; 2) *M. aeruginosa* + STC; 3) *M. aeruginosa* + *E. coli* + STC each in triplicates, during 14 days. All the treatments showed that *E. coli* and STC concentration decreased throughout the experiment, while *M. aeruginosa* showed an exponential growth. Both bacteria strains population decreases would be caused by a *M. aeruginosa*'s inhibitory mechanism. Further research is necessary to confirm this inhibitory effect.

INTRODUCCIÓN

La eutrofización de las fuentes de aguas superficiales es una problemática mundial. El aporte de nutrientes inorgánicos de origen antrópico tiene como resultado el aumento en la frecuencia y duración de floraciones producidas por cianobacterias. Una de las consecuencias de estas floraciones es la producción de toxinas (Giannuzzi et al., 2012) y entre las cianotoxinas más frecuentes y generalizadas se encuentran las microcistinas producidas por algunas de las poblaciones de *Microcystis spp.*, cepas de *Planktothrix spp.* y *Dolichospermum spp.* Los líquidos residuales cloacales, además de ocasionar problemas de eutrofización de los sistemas acuáticos producen contaminación microbiológica de origen fecal (bacterias, virus y parásitos), lo que potencia la problemática. El embalse Los Molinos (ELM) es un cuerpo de

agua mesotrófico con un avance marcado hacia la eutrofia con ocurrencia periódica de florecimientos de cianobacterias (Bazán et al., 2005). Desde el punto de vista bacteriológico, Larrosa (2006) reportó que los niveles de coliformes termotolerantes (indicadores de contaminación fecal) en el ELM se incrementan en épocas de lluvia, que la contaminación fecal es mayoritariamente causada por fuentes dispersas y que los principales factores que inciden en la contaminación están asociados al uso del suelo. Si se considera que en la última década el perillago del embalse ha sufrido una gran urbanización, con numerosas actividades recreativas en sus costas, resulta significativo el riesgo que esto implica para la salud humana. Debido a que se desconoce si existe alguna interacción entre el crecimiento de bacterias indicadoras de inocuidad o contaminación fecal del ELM, como *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* y el de cianobacterias, el objetivo de este trabajo fue evaluar esta hipótesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la interacción entre las bacterias indicadoras de inocuidad y las cianobacterias, se realizó un experimento en laboratorio donde se inocularon conjuntamente las cepas de bacterias provenientes del ELM (*Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*) y una especie de cianobacteria (*Microcystis aeruginosa*), bajo condiciones controladas y simulando las condiciones naturales durante verano.

Cepas: Las bacterias (*Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*) fueron aisladas del agua del embalse Los Molinos. Para la detección de *E. coli* se inoculó en caldo Lauril Sulfato alícuotas de las muestras de agua y se incubó a 37 °C durante 48 h. Los tubos positivos (con presencia de turbidez y gas) se repicaron en caldo EC con MUG e incubaron en baño termostatizado a 44,5 °C durante 24 h. Los tubos positivos (fluorescencia característica) se inocularon por agotamiento en placa con agar EMB e incubaron por 24 h a 37 °C (Figura 1).



Figura 1.- Aislamiento de *E.coli* de muestras de agua.

Las colonias que desarrollaron con un color verde metalizado y con halo blanco al observarse con lupa estereoscópica, fueron consideradas sospechosas de ser *E. coli*. Para su confirmación se realizó coloración de Gram. Las colonias que mostraron morfología de bacilo y G (-) se repicaron en medio semisólido S.I.M (Sulfuro, indol, movilidad) e incubaron a 37 °C durante 24 h para su confirmación por pruebas bioquímicas.

Para el aislamiento de STC se utilizó el caldo selectivo Azida Dextrosa. Los tubos con desarrollo positivo (presencia de turbidez) se repicaron en agar Bilis Esculina Azida (BEA),

ambos medios se incubaron durante 24 – 48 h a 37 °C. Las colonias sospechosas de ser *Enterococcus* (de color negro), se repicaron para su confirmación en caldo infusión de Cerebro – Corazón con 6,5 % de NaCl a 44,5 °C durante 48 h y a los resultados positivos se les realizó coloración de Gram. En el caso de STC se observaron cocos G (+).

La identificación de las cepas bacterianas aisladas también se realizó por biología molecular a partir de la extracción del ADN, la amplificación de los genes 16S ARNr por PCR, la cuantificación y secuenciación del ADN en el laboratorio de genética y biología molecular “University College of Southeast Norway” con sede en Noruega.

Tanto las cepas de *E.coli* como STC aisladas del agua del ELM fueron transferidas al caldo Luria Bertani con glicerol al 20 % para su congelación y almacenamiento. Luego para realizar los experimentos de interacción las cepas fueron nuevamente activadas en caldo Tripteína de Soja durante 24 h a 35 °C, posteriormente el cultivo se centrifugó a 3000 RPM durante 20 minutos. El pellet fue lavado dos veces con solución fisiológica estéril y se resuspendió en medio O₂ (Bomo et al., 2011) hasta obtener una concentración de 1×10^8 mL⁻¹, utilizando como inóculo 1 mL de la suspensión.

La cepa de cianobacterias utilizada fue un cultivo puro axénico de la cepa no toxigénica de *M. aeruginosa* PCC7806, mantenida en medio O₂ (Bomo et al., 2011).

Diseño del experimento: El experimento de interacción se realizó inoculando las bacterias y *M. aeruginosa* en Erlenmeyers de 250 mL con 120 mL de medio O₂.

Se establecieron 4 tratamientos control: 1) *M. aeruginosa* 2) *E. coli* 3) STC 4) *E. coli* + STC y tres tratamientos de interacción: 1) *M. aeruginosa* + *E. coli* (M-E) 2) *M. aeruginosa* + *Enterococcus* (STC) (M-S); 3) *M. aeruginosa* + *E. coli* + STC (M-E-S). Los tres tratamientos se realizaron por triplicado. Además se realizó un control positivo de cada uno de los microorganismos utilizados que consistió en la inoculación de una sola cepa en el medio de cultivo. El experimento tuvo una duración de 14 días, comprendiendo el período del 13 al 28 de diciembre del 2016. Las condiciones de experimentación se establecieron a 25 °C y con luz artificial de una intensidad de 3000 lux y con un fotoperiodo de 12:12 h (Figura 2).



Figura 2.- Fotografías del experimento día 0 y 14

El recuento se realizó tomando una muestra al día 0, 2, 5, 7 y 14. Se inoculó en superficie en agar EMB para *E. coli*, mientras los STC se inocularon en agar BEA (37° C, 24 – 48 h).

Para el recuento de *M. aeruginosa* se tomaron 2 mL de muestra de cada tratamiento y se agregó formol al 0,01%. Una alícuota del mismo fue dispuesta en una cámara de Fuchs–

Rosenthal (Marienfeld, Germany) y observada para su identificación y cuantificación en un microscopio óptico (Zeiss model D-7082, Germany). La cuantificación se realizó según LeGresley, C.M. & G. McDermott (2010).

EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Durante el período experimental, el crecimiento por separado tanto de los cultivos puros de *M. aeruginosa* como de *E. coli* y de STC aisladas del ELM (controles) fue exponencial, lo que indicaría que las condiciones experimentales aplicadas fueron óptimas. En particular, *M. aeruginosa* presentó una tasa de crecimiento de $0,38 \text{ d}^{-1}$ (Figura 3).

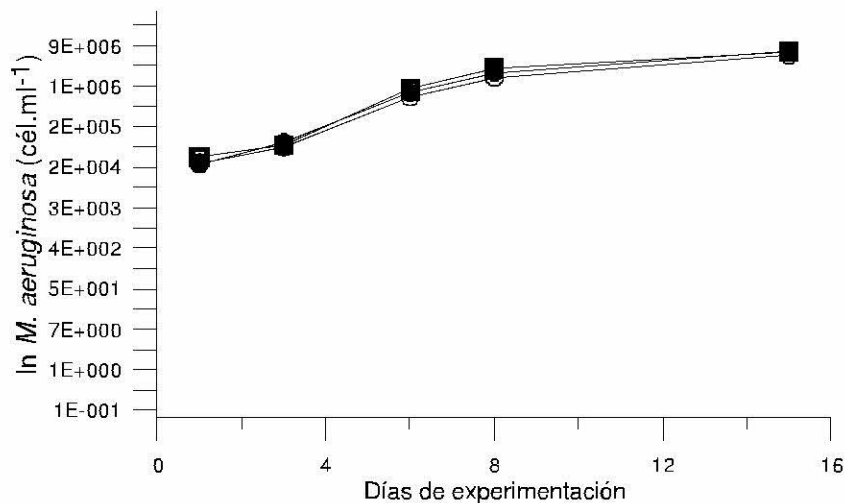


Figura 3.- Crecimiento de *M. aeruginosa* en medio O₂ a 25 °C, a una intensidad de luz de 3000 lux y un fotoperíodo de 12:12 h durante el período experimental del 13 al 28 de Diciembre del 2016.

Con respecto a los tratamientos de interacción, en los tres casos (*M-E*, *M-S* y *M-E-S*) se observó un crecimiento exponencial de *M. aeruginosa* muy similar al tratamiento control. Por otro lado, tanto *E. coli* como STC mostraron una disminución desde el día 1 al día 6 a valores no detectables, permaneciendo en estos niveles hasta el día 15. Específicamente, *E. coli* mostró un descenso de las UFC.ml⁻¹ a partir del día 3, presentando valores 65% más bajos en el tratamiento *M-E* y 89% en el tratamiento *M-E-S* con respecto al día 1 (Figura 4 A-C). Por su lado, STC no presentó disminución de los valores de UFC.ml⁻¹ del día 1 al día 3. Por el contrario, se observó un aumento aproximadamente de un 90% en el tratamiento *M-S* y de un 25% en *M-E-S*. En ambos casos, después de este incremento, se produjo un descenso exponencial del día 3 al 6, a partir del cual no se observan células viables (Fig. 4 B-C). Lo anterior podría indicar, que a pesar de que ambas cepas de bacterias serían afectadas negativamente por la presencia de *M. aeruginosa*, *E. coli* se mostraría más sensible. Además, se observa que en el tratamiento de interacción con las dos bacterias, la respuesta negativa de ambas cepas es más marcada, en comparación a los tratamientos unitarios (*M-E* y *M-S*).

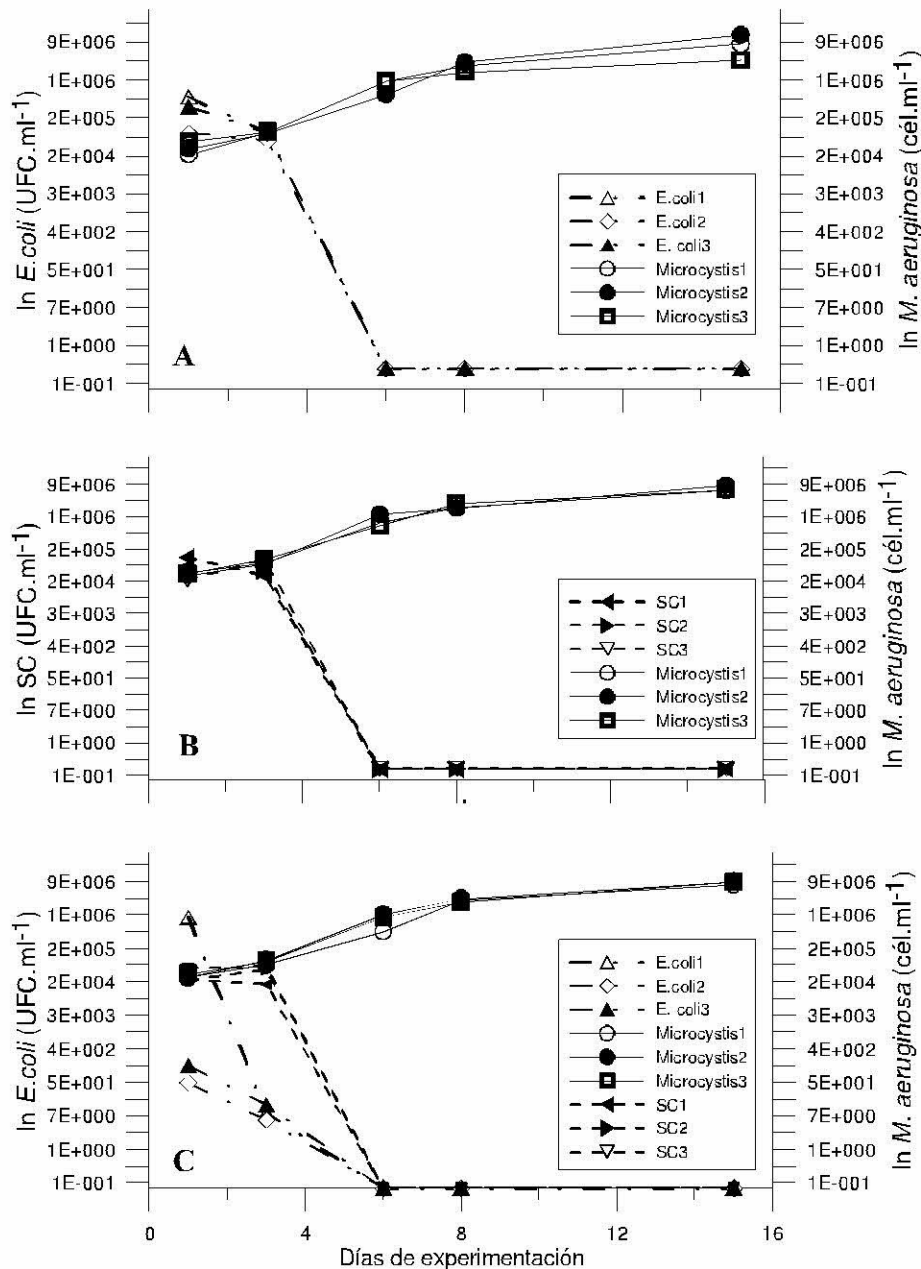


Figura 4.- Experimentos de interacción entre cianobacterias y bacterias patógenas: A.-*M.aeruginosa* y *E.coli* B.-*M.aeruginosa* y *Enterococcus* sp. (STC) C.- *M.aeruginosa* y *E. coli* + *Enterococcus* sp. (STC). Todos los cultivos fueron mantenidos en medio O2 a 25 °C , a una intensidad de luz de 3000 lux y un fotoperíodo de 12:12 h.

Diversas investigaciones experimentales, han confirmado una disminución del crecimiento de cepas de bacterias patógenas en presencia de algunas especies de cianobacterias en crecimiento exponencial (Dahms et al. 2006, Abed et al. 2008, Bomo et al. 2011). Por ejemplo, Østensvik et al. (1998) reportaron una relación lineal entre la inhibición del crecimiento de bacterias y la concentración del cultivo de una especie de cianobacteria. Otros autores observaron en estudios de campo, durante eventos de floración de cianobacterias

($\geq 5 \times 10^4$ a 1×10^6 cél.ml⁻¹), una relación inversa entre su concentración y la de bacterias coliformes termotolerantes (CTt), disminuyendo las CTt (Halac et al., 2012).

Este efecto negativo podría ser explicado por la presencia de metabolitos secundarios antibacteriales, que son efectivos tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, pero que no están relacionadas con el metabolismo de las cianotoxinas (Abed et al. 2008).

CONCLUSIONES

Las bacterias aisladas del embalse Los Molinos cuando se inocularon en forma separada, tuvieron un crecimiento exponencial en el sistema experimental propuesto. Estas condiciones intentaron reproducir las condiciones ambientales promedio del embalse, por lo que se evidencia que los microorganismos están bien adaptados y la selección de los parámetros de ensayo fue correcta. Por otro lado, cuando se las inoculó en forma combinada con *M. aeruginosa*, se produjo la inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli* y STC, tanto cuando se las colocó en forma unitaria *M. aeruginosa* + *E. coli* ó *M. aeruginosa* + STC como cuando se los cultivó a todos en conjunto. Se requieren realizar más estudios para confirmar este efecto inhibitorio y comprobar si *M. aeruginosa* segrega alguna sustancia con efecto antibiótico al medio, que pudiera ser responsable de la inhibición del crecimiento observada.

Agradecimiento. Los autores agradecen a FONCYT que subsidió el PICT 2014-3298, el cual permitió la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abed, R.M.M., Dobretsov, S. & Sudesh, K. (2008). "Applications of Cyanobacteria in biotechnology". J. Appl. Microbiol. ISSN 1364-5072, Junio 2008, pp. 1-12.

APHA (American Public Health Association) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th edition, Washington, D.C

Bazán, R., Corral, M., Pagot, M., Rodríguez, A., Oroná, C., Rodríguez, M.I., Larrosa, N.B., Cossavella, A., del Olmo, S., Bonfanti, E. & F. Busso. (2005). "Remote sensing and numerical modeling for the water quality analysis of the Los Molinos reservoir in Córdoba, Argentina". Ingeniería Hidráulica en México, No 20, April-June 2005, pp. 121-135.

Bomo, A.M., Tryland, I., Haande, S., Hagman, C.H.C. & H. Utkilen. (2011) "The impact of Cyanobacteria on growth and death of opportunistic pathogenic bacteria". Water Science Technology, No 64, Abril 2011, pp. 384-390.

Dahms, H.U., Xu, Y. & Pfeiffer, C. (2006). Antifouling potential of Cyanobacteria: a mini-review. Biofouling, No 22, pp. 317-327.

Giannuzzi, L. (2011). Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Ministerio de Salud de la Nación, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Giannuzzi, L., Carvajal, G., Corradini, M.G., Araujo Andrade, C., Echenique, R. and D. Andrinolo. (2012). "Occurrence of toxic Cyanobacterial blooms in Rio de la Plata estuary,

Argentina: Field study and data analysis". *Journal of Toxicology*, Hindawi, ID 373618 Vol. 2012, pp. 1-15.

Halac S, Nadal F, Rodríguez MI, Larrosa N, Ruiz M, Ruibal Conti AL, Brandalise MV, Olivera P, Licera C. (2012). Variabilidad e interacción microbiológica - ambiental en playas de dos embalses de la Provincia de Córdoba (Argentina). 5º Congreso Argentino de Limnología, CAL5. INALI- UNL, Santa Fé, Argentina.

Larrosa, N.B. (2006) Identification of fecal contamination sources at Los Molinos reservoir. Differentiation between human or animal origin (in Spanish). Master Thesis, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina).

LeGresley, C.M. & G. McDermott. (2010). Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis* (B. Karlson, C. Cusack, E. Bresnan, eds) Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC), Manuals and Guides, UNESCO, pp.25-30.

Østensvik, Ø., Skuberg, O.M., Underdak, B. & Hormazabal, V. (1998) "Antibacterial properties of extracts from selected planktonic Cyanobacteria: A comparative study of bacterial bioassays". *J. Appl. Microbiol.*, N° 84, pp. 1117–1124.