

El rol de las partículas sólidas en la persistencia de bacterias en aguas recreativas y sus implicancias en la salud pública: un estudio preliminar

Dolores Gutiérrez-Cacciabue ^{a, b*} y Verónica B. Rajal ^{a, b, c*}

^a Instituto de Investigaciones para la Industria Química – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de Salta (INIQUI–CONICET, UNSa), Av. Bolivia 5150, Salta, 4400, Argentina. Teléfono: (54-387) 425-5410; Fax: (54-387) 425-1006.

^b Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta (UNSa), Av. Bolivia 5150, Salta, 4400, Argentina.

^c Singapore Centre for Environmental Life Sciences Engineering (SCELSE), Nanyang Technological University, Singapore

*dolo83@gmail.com, vbrajal@gmail.com

RESUMEN

La contaminación microbiológica de ambientes acuáticos recreativos es una preocupación global ya que el 80% de las enfermedades de origen hídrico son causadas por microorganismos que llegan a las aguas través de las heces, partículas orgánicas e inorgánicas y otros restos que producen personas infectadas. Para evaluar la calidad microbiológica se realizan monitoreos en los que se determinan bacterias indicadoras de contaminación fecal, según lo establece la legislación. A pesar de los avances realizados en métodos de detección y control, se siguen informando enfermedades de transmisión hídrica. Esto puede deberse a que existen otros factores ambientales que influyen en la persistencia de los microorganismos en el agua. Una de las causas principales de la persistencia es la presencia de partículas sólidas. Los microorganismos pueden encontrarse, y eventualmente transportarse, en el agua ya sea libres o adheridos a dichas partículas. En épocas de bajo caudal, algunas partículas pueden sedimentar con los microorganismos adsorbidos, sacándolos de la columna de agua y aumentando así su persistencia. El proceso de resuspensión por una actividad recreativa o por turbulencia natural, causa el retorno de estas partículas sólidas con los microorganismos adheridos a la superficie y su probable desorción, convirtiéndose en un riesgo para la salud de los usuarios. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que ejercen las partículas sólidas en diferentes matrices acuosas ambientales sobre la persistencia de dos bacterias indicadoras. Se realizaron ensayos discontinuos de sedimentación-resuspensión en el laboratorio utilizando cuatro matrices acuosas preparadas con aguas ambientales de uso recreativo: dos con baja y dos con alta turbidez. En cada matriz se sembraron concentraciones conocidas de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Se homogeneizaron y se tomaron

muestras superficiales en el tiempo para evaluar su desaparición durante la sedimentación. Simultáneamente se midió la turbidez. Cuando el recuento de colonias estuvo por debajo del límite de detección, se realizó una resuspensión y se cuantificó nuevamente. La cinética de desaparición se evaluó mediante un modelo matemático de primer orden, de donde se obtuvieron distintos parámetros cinéticos. Aunque se observó una mayor persistencia de *Escherichia coli* comparada con *Enterococcus faecalis* en presencia de partículas sólidas, lo cual se evidenció en la reaparición de bacterias cultivables ante la resuspensión de las matrices con alta turbidez, los valores de las constantes cinéticas de desaparición fueron similares para matrices con baja y alta turbidez. Esto indicaría que otras características del agua pueden estar influenciando en dicha persistencia. El uso de parámetros cinéticos calculados experimentalmente en modelos de evaluación de riesgo y calidad de agua es de gran importancia ya que permite obtener resultados más realistas de la situación.

ABSTRACT

Microbiological pollution of recreational aquatic environments is a global concern since 80% of water-borne diseases are caused by microorganisms that reach the water through feces, organic and inorganic particles and other residues excreted by infected people. The assessment of microbial water quality is carried out through monitoring campaigns where fecal indicator bacteria are measured, according to legislation. Despite the advances made in detection and control methods, water-borne outbreaks are still reported. It is then possible that other environmental factors are influencing on the persistence of microorganisms in water. One of the main causes of persistence is the presence of solid particles. Microorganisms can be found and eventually transported in water as planktonic cells or attached to particles. During low flow rate events, some particles can sediment with microorganisms adsorbed, removing them from the water column and thus increasing their persistence. The resuspension process due to recreational activities or natural turbulence causes the return of these solid particles with the microorganisms attached and their probable desorption, becoming a health risk for users. The aim of this work was to evaluate if the presence of solid particles in different environmental matrices with recreational uses exerts some effect on the persistence of two indicator bacteria. Sedimentation-resuspension tests were carried out in the laboratory using four water matrices prepared with recreational ambient waters: two with low and two with high turbidity values. Known concentrations of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were spiked on each matrix and homogenized. Samples were taken from the surface over time to evaluate their disappearance during sedimentation process. Turbidity decrease over time was also measured. When colony count was below the detection limit, a resuspension was performed, and bacteria were quantified again. A first-order decay model was applied from which different kinetic parameters were obtained. Although a greater persistence of *Escherichia coli* compared to *Enterococcus faecalis* was observed in the presence of solid particles, which was evidenced in the reappearance of culturable bacteria after resuspension of matrices with high turbidity, the decay constant rates was similar for matrices for both low and high turbidity. This would

indicate that other water characteristics rather than turbidity may be influencing on their persistence. Finally, the determination of kinetic parameters is of quite importance due to their potential inclusion into risk assessment and water quality models, allowing a better analysis of the situation.

PALABRAS CLAVE

Aguas ambientales recreativas, bacterias indicadoras, persistencia, partículas sólidas, parámetros cinéticos

KEY WORDS

Recreational environmental waters, bacterial indicators, persistence, solid particles, kinetic parameters

CONTEXTO

El presente trabajo se desarrolló gracias a la financiación del Fogarty International Center de la Universidad de Davis, California, de los National Institute of Environmental Health Sciences (Estados Unidos) NIH Grant # D43 TW005718 y al subsidio de los Proyectos 2070/4 y 2070/1 del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Salta. La Dra. Dolores Gutiérrez Cacciabue contaba al momento de la realización de este trabajo, con una beca doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

INTRODUCCION

Desde la antigüedad las personas utilizan las aguas ambientales como ríos, lagos, embalses, aguas termales, entre otros, con fines recreativos. Sin embargo, el crecimiento ininterrumpido de la población sumado a las necesidades por la disponibilidad de agua, ocasionaron que la calidad de estos ambientes disminuyera drásticamente, convirtiéndose en una potencial fuente de riesgo para la salud de los bañistas. Las principales causas de contaminación son las aguas residuales domésticas e industriales volcadas ilegalmente a los cursos de agua, las actividades recreativas y el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas en agricultura [1]

ocasionando no solamente problemas en la salud humana sino también en la ecología de dichos ambientes acuáticos [2]. Una temática crucial relacionada con esta situación es la presencia de microorganismos principalmente patógenos, ya que éstos pueden provocar enfermedades de origen hídrico como cólera, gastroenteritis, hepatitis, foliculitis, infecciones de oídos, ojos y enfermedades de contacto con la piel por el uso recreativo [3]. Se considera que estos agentes patógenos son los responsables de la mayor parte de la mortalidad infantil en los países en desarrollo [4]. El riesgo latente sobre la salud debido a la presencia de microorganismos estará ligado a su vez al uso del agua ya sea para consumo, recreación, riego, pesca o navegación, entre otros [5]. Con el afán de conocer la calidad microbiológica de estos ambientes se llevan a cabo monitoreos, en donde se analizan bacterias indicadoras, según se encuentra establecido por legislación [3, 6, 7, 8]. El uso de indicadores bacterianos surge por la facilidad de su determinación y por la imposibilidad práctica de medir cada uno de los patógenos que pueden estar presentes. Los más comúnmente usados son los coliformes totales y fecales. Otras dos bacterias que se han comportado bien como indicadores de contaminación son enterococos y *Escherichia coli* [9, 10].

A pesar de los avances realizados en materia de metodologías de detección y control microbiano para así mejorar la calidad microbiológica del agua, todavía siguen apareciendo enfermedades de origen hídrico. Esto indicaría entonces que existen otros factores ambientales que podrían estar interfiriendo en la persistencia de los microorganismos en el agua. Una de las variables más importante relacionada con la persistencia, es la presencia de partículas sólidas. Los microorganismos pueden encontrarse en el agua, libres o adheridos a partículas en suspensión, principalmente de tamaños cohesivos o finos [11]. Aquellos microorganismos que se encuentran adheridos a las partículas no son tan susceptibles a algunos estresores ambientales (como la luz solar o los tratamientos) como los microorganismos libres, pudiéndose transportar hacia otros lugares [12], brindándoles protección y por consiguiente mayor supervivencia en el ambiente [13].

Durante épocas de bajo caudal de ríos, las partículas con los microorganismos adheridos a ellas pueden sedimentar, sacándolos de la columna de agua y conduciéndolos hacia el lecho, aumentando así su persistencia y el riesgo latente en dicho ambiente. El proceso de resuspensión de partículas sólidas debido a actividades antropogénicas (uso recreativo), a las precipitaciones o a la turbulencia natural del agua, puede provocar el retorno de una diversidad de contaminantes a la superficie del agua [14, 15] en especial de microorganismos perjudiciales cuya probable desorción de los sólidos, los convierte en nuevamente en un riesgo para la salud humana [16]. La mayor supervivencia de microorganismos en el ambiente es preocupante debido a los peligros a los que están expuestos los humanos ante una eventual ingestión [12, 17].

En la Provincia de Salta, las precipitaciones ocurren principalmente durante el verano (estación húmeda, de noviembre a marzo), ocasionando un incremento notable de caudal y turbulencia en los ríos. Esto provoca la resuspensión de las partículas, principalmente finas como arcillas, depositadas en el lecho de los ambientes acuáticos [15]. Ante las altas temperaturas del verano, los bañistas hacen uso de estas aguas, sin darle importancia a la alta turbidez y sin saber que existe un riesgo latente [18] debido a distintos contaminantes (entre

ellos patógenos) que pueden estar adsorbidos a partículas depositadas en el lecho [14, 15] y principalmente por posibles infecciones por microorganismos adsorbidos que reaparecen en la superficie acuosa [15]. Esto también se debe a que la información que existe con respecto a la contaminación por microorganismos adheridos a partículas sólidas no es suficiente y hay pocos datos en lo que concierne a su persistencia en el lecho y su posible liberación a la superficie del ambiente acuático en cuestión [19].

OBJETIVO

Según lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la presencia de partículas sólidas en diferentes matrices acuosas ambientales de uso recreativo, ejercen algún efecto sobre la persistencia de dos bacterias indicadoras, *Enterococcus faecalis* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa), mundialmente usadas para el control de la calidad microbiológica de aguas con ese uso.

METODOLOGIA

Se realizaron ensayos en el laboratorio denominados de sedimentación-resuspensión utilizando matrices acuosas preparadas con aguas ambientales, las cuales presentaban distintos valores de turbidez.

Recolección y caracterización de aguas ambientales

Para realizar los ensayos de sedimentación-resuspensión, en primer lugar, se colectaron muestras (una de cada ambiente en cuestión) de agua de cuatro ambientes acuáticos pertenecientes a la Provincia de Salta, noroeste de la República Argentina: los Ríos La Caldera (M1) y Vaqueros (M2), ubicados en la localidad de La Caldera; el Río Arenales (M3) que atraviesa la ciudad de Salta; y aguas de las Termas de Rosario de la Frontera (M4) (Aguas Termales) en el Departamento del mismo nombre (Figura 1). Los usos de estos ambientes son principalmente recreativos.

Estos cuatro ambientes acuáticos, previamente monitoreados y caracterizados durante un año [20, 21], se seleccionaron para este estudio teniendo en cuenta la turbidez de sus aguas: dos con bajos (Aguas Termales y Río Vaqueros) y dos con altos (Río Arenales y Río La Caldera) valores turbidez (Figura 1).

De cada ambiente en cuestión se recolectaron 10 litros de agua en recipientes de plástico limpios y previamente enjuagados con la misma agua a analizar. A cada muestra se le

midieron *in situ* variables fisicoquímicas: pH, turbidez (en UNT), temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/l), salinidad (%) y conductividad (µS/cm) con un analizador multiparamétrico (U10 Horiba, Japón). Se tomaron muestras de agua adicionales en recipientes estériles de 100 ml para la determinación de *E. coli* y enterococos [22].

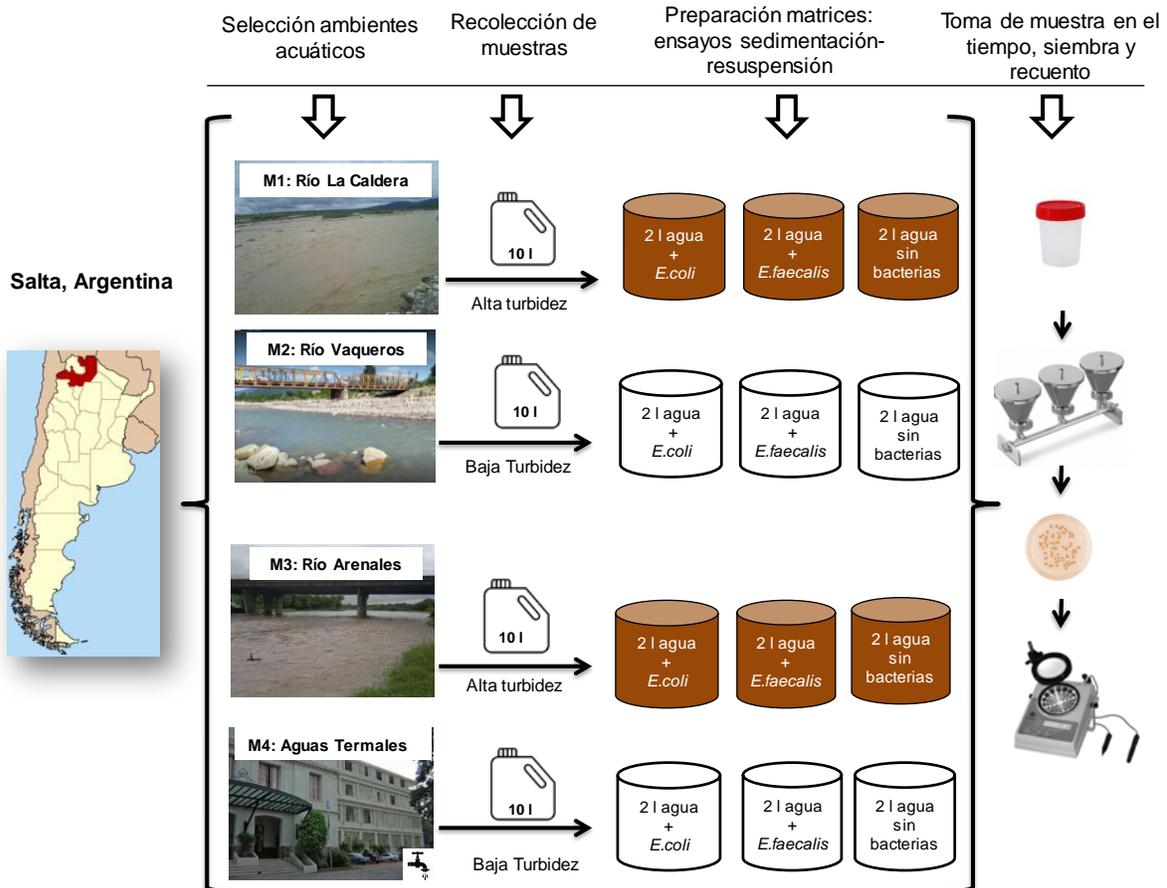


Figura 1. Esquema del ensayo de sedimentación-resuspensión de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) utilizando cuatro matrices acuosas ambientales con alta (M1 y M3) y baja (M2 y M4) turbidez.

Selección de los modelos bacterianos y preparación del stock

Ante la limitación, presupuestaria y de bioseguridad (los stocks en general se deben preparar en altos títulos, lo que representa un riesgo para la salud), de realizar los ensayos con microorganismos patógenos, se han empleado dos bacterias modelo como sustitutas de patógenos bacterianos: *Escherichia coli* (como modelo de bacteria Gram-negativa) y *Enterococcus faecalis* (como un modelo de Gram-positiva). Las concentraciones utilizadas

en los experimentos realizados fueron seleccionadas a partir de valores reales encontrados en distintos ambientes naturales anteriormente estudiados [23].

La preparación del stock bacteriano utilizado para los ensayos de sedimentación-resuspensión, se realizó a partir de dos cepas de colección: *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), ésta última como representante del grupo de *Enterococcus* sp. Se inoculó cada cepa en dos tubos con 5 ml de caldo nutritivo (Britania, Argentina) cada uno y se incubó a $37 \pm 0,5$ °C 18 h, para obtener un volumen final de 10 ml para cada cepa. Se centrifugó a $4000 \times g$ durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células con 0,5 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1×. Se agitó y se repitió el procedimiento dos veces para eliminar todo residuo del caldo y evitar el crecimiento bacteriano. La concentración inicial de los stocks a sembrar en las matrices acuosas fue de $7,7 \times 10^6$ UFC/ml para *Escherichia coli* y 8×10^6 UFC/ml para *Enterococcus faecalis*. Los stocks obtenidos (determinados mediante recuento en placa en medio *Agar Plate Count*), se utilizaron y sembraron por separado, en las respectivas matrices acuosas.

Ensayos de sedimentación-resuspensión con matrices ambientales

Una vez que se contó con el agua ambiental, ya caracterizada y los stocks de bacterias respectivos, se procedió a llevar adelante los ensayos de sedimentación-resuspensión. Los experimentos, por cuestiones operativas debido a la cantidad de muestras a analizar, se realizaron primero para dos ambientes en simultáneo, uno de alta y otro de baja turbidez, y luego para los otros dos con el mismo criterio. Por lo tanto, las comparaciones se realizaron de a pares: el Río La Caldera (M1) con el Río Vaqueros (M2) y el Río Arenales (M3) con las Aguas Termales (M4), siendo matrices de alta y baja turbidez, respectivamente. Para ello se llenaron con cada una de las cuatro matrices acuosas ambientales recolectadas, tres recipientes de plástico (5 l) con 2 litros del agua cada uno, obteniendo un total de 12 recipientes. A ocho de los doce recipientes, se les sembró 300 µl del stock bacteriano respectivo, previamente preparado (concentración final 1×10^3 UFC/ml aproximadamente): cuatro recipientes con *Escherichia coli* (*E. coli*) y cuatro con *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Figura 1). Esta siembra se realizó, dada la baja concentración de estos microorganismos encontrados originalmente en las muestras ambientales, para evitar que en poco tiempo se alcanzara el límite de detección de las técnicas usadas. Los cuatro recipientes restantes, sin la siembra de microorganismos, se utilizaron para medir la variación de la turbidez de la zona superficial de cada matriz acuosa en el tiempo. A continuación, se agitaron manualmente con una varilla los recipientes durante 3 min para homogenizar y se tomaron muestras, en distintos tiempos, de la zona superficial de cada uno de los sembrados para realizar el recuento bacteriano en cajas de Petri y evaluar la cinética de desaparición, ya sea por sedimentación, inactivación y/o muerte. Al mismo tiempo en que se tomaron muestras de los recipientes con microorganismos, se midió también la turbidez en la zona superficial de los recipientes control (matrices acuosas sin microorganismos) utilizando el medidor multiparamétrico Horiba U10 (Horiba, 1991), con el objeto de determinar la cinética de sedimentación de los sólidos presentes. Al cabo de unos días, cuando no se observó más

crecimiento en las cajas de Petri, se agitaron los recipientes para provocar la resuspensión de los sólidos sedimentados, se tomaron muestras y se analizaron nuevamente.

Recuento bacteriano

La cuantificación de las bacterias se realizó por el método de filtración por membrana [22]. El mismo consiste en filtrar 100 ml de agua, previamente homogeneizada, y sus respectivas diluciones (50, 10, 1 0,1, dependiendo del caso), a través de una membrana de nitrato de celulosa estéril (tamaño de poro de 0,45 μm y 47 mm de diámetro; Sartorius, Alemania) en un sistema de manifold de tres ramas y embudos de acero inoxidable (Sartorius, USA) y bomba de vacío Microsart® e.jet (Sartorius, Alemania). Finalizada la filtración, se colocaron las membranas en cajas de Petri con el medio de cultivo adecuado y se incubaron. Se realizó el recuento en las placas que presentaron entre 20 y 80 colonias y los resultados se expresaron en UFC/100 ml. Para *E. coli* se utilizó el medio mTEC modificado (Fluka, USA) incubando a 37 ± 3 °C durante 2 h y luego a $44,5 \pm 3$ °C durante 22 h [24] Por su parte, *E. faecalis* se sembró en medio mEnterococcus Agar (Difco, USA) a 41 ± 3 °C, 48 h y se realizó la confirmación en Esculina-Hierro Agar (EIA) a 41 ± 3 °C durante 20 min [25].

Cálculo de parámetros cinéticos

La velocidad de desaparición de microorganismos de la superficie del agua, ya sea por sedimentación, inactivación (paso al estado viable pero no cultivable) y/o muerte (no viable), se determinó utilizando una ecuación cinética de primer orden (Ec. 1) de acuerdo con la Ley de Chick [26]:

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (1)$$

Integrando esa ecuación se obtuvo:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (2)$$

siendo C (UFC/100 ml) la concentración de bacterias presentes en un tiempo t (h), C_0 (UFC/100 ml) la concentración inicial de bacterias y k (h^{-1}) la constante de desaparición que incluye: la sedimentación, la inactivación y/o muerte.

La ecuación (2) también se puede expresar como:

$$\text{Ln} \frac{C}{C_0} = -kt \quad (3)$$

Donde la constante k (h^{-1}) es el valor de la pendiente obtenida por regresión lineal. De esta regresión se obtiene el coeficiente de determinación (R^2) el cual es un valor estadístico que

mide el grado de asociación lineal entre los ejes x e y , indicando cuán bien se ajusta la ecuación de regresión a los datos experimentales.

Se calculó también el T_{90} (h) que se definió como el tiempo necesario para que el 90% de las bacterias sedimento, se inactive o muera.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización de las matrices ambientales

Antes de llevar a cabo los ensayos de sedimentación-resuspensión, se realizó una caracterización del agua de los ambientes desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico (Tabla 1). La turbidez fue una de las variables que presentó mayor variabilidad entre las muestras con valores en el rango de 2 a 900 UNT (Tabla 1). La turbidez es una medida del grado en el cual el agua pierde su transparencia debido a la presencia de partículas en suspensión. Aunque por sí misma la presencia de dichas partículas no tiene efectos sobre la salud de los usuarios, puede ser un indicador indirecto de la presencia de microorganismos (adsorbidos a ellas) causantes de enfermedades de origen hídrico (www.epa.gov).

La conductividad fue otra de las variables fisicoquímicas que diferenció a las matrices acuosas ambientales, encontrándose el valor máximo en las aguas termales (Tabla 1). En general estas aguas se caracterizan por presentar altas concentraciones de sustancias minerales disueltas que son las responsables de los altos valores de conductividad eléctrica, valores normales para este tipo de ambientes acuáticos. Sin embargo, en algunos casos, los valores elevados de conductividad pueden indicar una abundancia de sales disueltas debido a un manejo pobre de la irrigación, a minerales arrastrados por la lluvia o a otro tipo de descargas [27].

Es importante aclarar que el valor de temperatura registrado en las aguas termales (Tabla 1) fue medido al inicio del ensayo, pero no es el valor real de temperatura a la cual surgen estas aguas de los manantiales. Las Termas de Rosario de la Frontera están integradas por numerosos manantiales donde la mayoría de ellos tienen una temperatura de surgencia que oscila entre 70 y 92 °C. Los valores elevados de temperatura pueden en algunos casos, inhibir el crecimiento de algunos microorganismos como *E. coli* y enterococos, no siendo entonces detectados con técnicas cultivo-dependientes. Sin embargo, en las piletas las temperaturas no son tan altas como cuando surgen de los manantiales por lo que el intenso uso recreativo o el mismo contacto con el medio ambiente, puede ocasionar una disminución en la calidad de agua y por consiguiente la aparición de algunas de estas bacterias indicadoras de contaminación fecal.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y microbiológicas iniciales para los cuatro ambientes acuáticos en estudio.

Variable	Río La Caldera (M1)	Río Vaqueros (M2)	Río Arenales (M3)	Aguas Termales (M4)
Temperatura (° C)	18,9	21,9	20,0	20,0
pH	8,3	8,1	8,0	8,9
Oxígeno Disuelto (mg/l)	7,2	7,0	6,3	5,1
Conductividad (µS/cm)	207	88	217	827
Turbidez (UNT)	999 ^a	2	412	3
<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)	1200	1730	200	ND
Enterococos (UFC/100 ml)	190	100	ND	ND

ND: no detectado

^a Este valor de turbidez es el máximo que puede medir el equipo utilizado. Indica que el valor medido es tan grande que se fue de escala (Turbidez de la muestra de agua mayor a 999 UNT).

Sedimentación-resuspensión de *E. coli* y *E. faecalis* en las matrices acuosas ambientales

Como se mencionó en un principio, los ensayos de sedimentación-resuspensión se realizaron comparándolos de a pares: el Río La Caldera con el Río Vaqueros y el Río Arenales con las Aguas Termales (Figura 1), siendo matrices de baja y alta turbidez, respectivamente, en cada par. En todos los casos, durante el transcurso de ambos experimentos, las bacterias fueron desapareciendo de la zona superficial en el tiempo tanto para las matrices de alta como de baja turbidez (Figura 2).

Para el caso de *E. coli* en el primer ensayo realizado, la velocidad de desaparición de esta bacteria de la columna de agua fue similar para las matrices M1 y M2 presentando valores de cinco y cuatro reducciones logarítmicas, respectivamente (Figura 2 a). A pesar de lo mencionado anteriormente, se pudo observar que a las 120 h la concentración de *E. coli* en M1 (Río La Caldera) estuvo por debajo del límite de detección de la técnica (Figura 2 a). No ocurrió lo mismo para esta bacteria en M2 (Río Vaqueros) en donde, a partir de las 74 h aproximadamente la concentración se mantuvo prácticamente constante, y por arriba del valor de M1, pudiendo ser todavía detectada antes de que se produjera la resuspensión.

Al momento de realizar la resuspensión (a las 150 h), reapareció *E. coli* en la columna de agua tanto en M1 como en M2 en concentraciones similares (Figura 2 a), con valores de recuento de *E. coli* que superaron los límites establecidos para aguas recreativas de contacto primario (235 UFC/100 ml para *E. coli*; [28]).

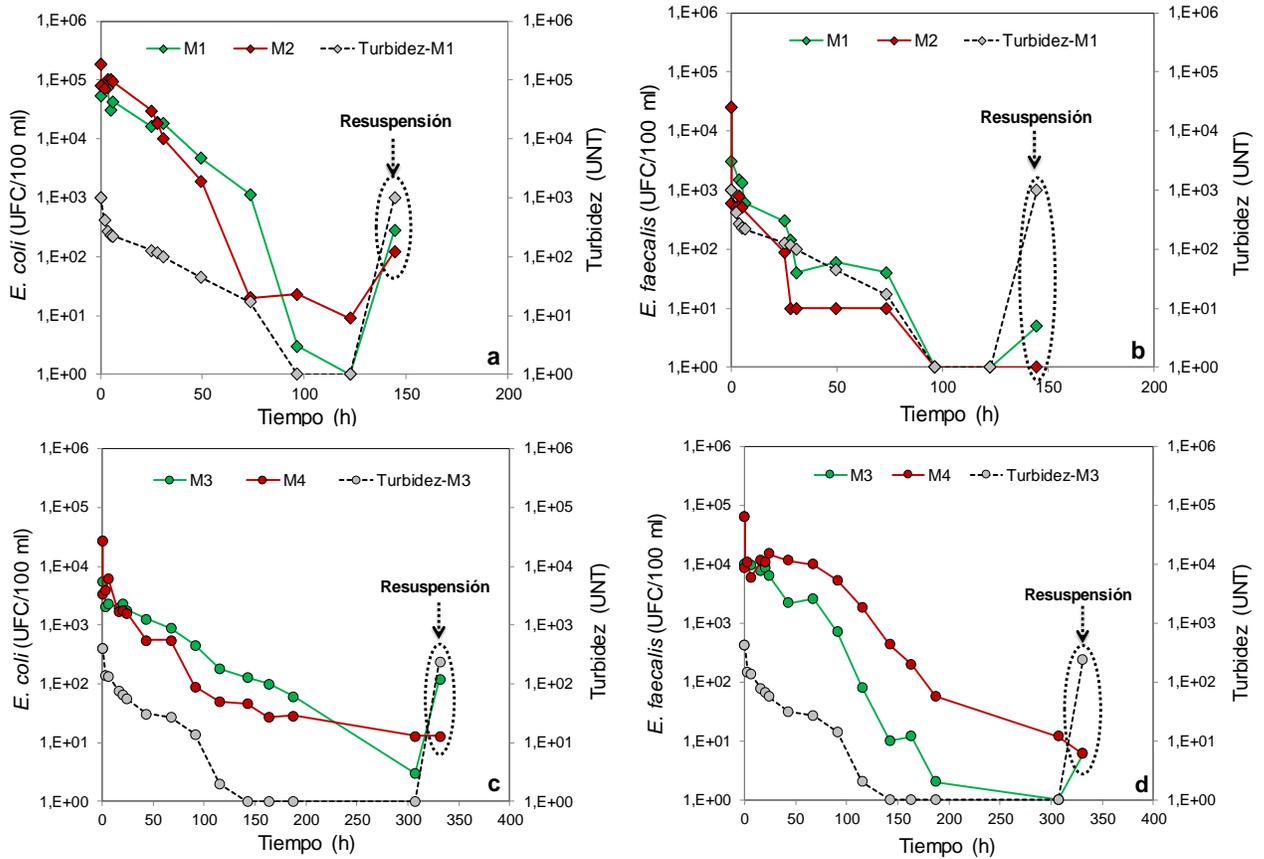


Figura 2. Ensayos de sedimentación-resuspensión de *Escherichia coli* (*E.coli*, a y c) y *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*, b y d) utilizando cuatro matrices acuosas ambientales (comparación de a pares): M1 (Río La Caldera) con M2 (Río Vaqueros); M3 (Río Arenales) con M4 (Aguas Termales), siendo matrices de alta (M1 y M3) y baja (M2 y M4) turbidez, respectivamente. Se representan también los valores de disminución de la turbidez del Río La Caldera y del Río Arenales en el tiempo. Los valores de turbidez del Río Vaqueros y de las Aguas Termales no se muestran ya que se mantuvieron entre 1-3 UNT durante todo el experimento.

Algunas bacterias durante la interacción con las partículas en suspensión, pueden adsorberse a éstas, logrando por lo tanto sedimentar más rápidamente que aquellas que se encuentran libres [16]. Sin embargo, esta velocidad de desaparición puede variar dependiendo también del tamaño de las partículas presentes. Como se mencionó anteriormente, la desaparición de *E. coli* de la superficie de ambas matrices no presentó diferencias entre sí, por lo que se podría

pensar que existen otras causas que afectan su persistencia en el ambiente acuático [29]. En general, la supervivencia de los microorganismos en el ambiente depende de muchos factores, no solo de la presencia de partículas sólidas, sino también de la composición del agua, de factores ambientales, de la presencia de predadores y de los usos que se le da al ambiente [13] por lo que todo esto deberá ser tenido en cuenta a la hora de interpretar estos datos.

Es importante aclarar también que en las muestras tomadas durante el primer día no se observó disminución significativa en la cantidad de *E. coli* comparada con la disminución de turbidez. Esto podría indicar que las bacterias se adhirieron predominantemente a las partículas de menor tamaño y sedimentaron con ellas en un tiempo posterior a que lo hicieran las partículas más pesadas. Auer y Niehaus [30] reportaron que el 90% de los organismos sedimentados estaban asociados a partículas de menor tamaño como limos o arcillas. Esto es esperable ya que los sedimentos cohesivos como las arcillas presentan gran superficie de contacto por unidad de masa y alta capacidad de sorción, siendo superficies iónicamente cargadas, lo que da origen a una interacción electrostática entre las partículas [11]. Existe entonces una mayor cantidad de sitios disponibles para que se produzca la adsorción preferencial de los microorganismos a este tipo de partículas.

Por otro lado, la disminución de *E. faecalis* se debió principalmente a la inactivación y/o muerte más que a adsorción a partículas sólidas, ya que una vez realizada la resuspensión, sólo reaparecieron 5 UFC/100 ml en M1 (Río La Caldera, alta turbidez) y ninguna en M2 (Río Vaqueros, baja turbidez) (Figura 2 b). El valor encontrado no llegó a superar el límite establecido para por las legislaciones de uso recreativo (71 UFC/100 ml; [28]).

La mayor afinidad observada de *E. coli* con las partículas sólidas comparada con la de *E. faecalis* fue informada también por otros autores, que sugieren que *E. coli* es capaz de adherirse a un amplio rango de tamaños, porque su motilidad y forma alargada la hace capaz de unirse a diferentes ángulos o caras de éstas [31]. Para el caso de enterococos, pareciera ser que se adaptan mejor y sobreviven por mayores tiempos en agua salada que en agua dulce [32]. Por otro lado, al ser aguas ambientales, es posible la presencia de otros microorganismos que dan lugar a la existencia de interacciones microbianas, ya sea de competencia o predación, que pudieran estar influenciando también en la supervivencia de estas bacterias [33].

Para el ensayo de sedimentación-resuspensión de *E. coli* y *E. faecalis* utilizando aguas del Río Arenales (M3) y Aguas Termales (M4), de alta y baja turbidez, respectivamente, la resuspensión se realizó a las 330 horas (14 días, aproximadamente), cuando el recuento de colonias se encontró por debajo del límite de detección (Figura 2 c y d). Se observó también una mayor supervivencia de *E. coli* comparada con *E. faecalis* en la matriz con alta turbidez (M3: Río Arenales), con reducciones de tres y cuatro unidades logarítmicas respectivamente (Figura 2 c).

En el caso de las Aguas Termales (M4), con baja turbidez, la resuspensión no tuvo efectos en cuanto a la cantidad de bacterias determinadas, tanto para *E. coli* como para *E. faecalis*, sufriendo reducciones logarítmicas de dos y tres unidades, respectivamente (Figura 2 d).

La desaparición de *E. faecalis* de la superficie de la matriz con aguas termales fue más lenta que en la del Río (aunque al final la concentración determinada para ambas matrices fue semejante). Esta menor velocidad de desaparición de *E. faecalis* en aguas termales pudo deberse a una mejor adaptación de esta bacteria cuando la concentración de sales disueltas en la matriz acuosa es mayor [32]. Sin embargo, al realizar la resuspensión, se encontró una concentración menor a la detectada en el tiempo anterior inmediato, sugiriendo que, aunque la desaparición de la superficie fue lenta, ésta se debió principalmente a la inactivación y/o muerte.

Cinética de desaparición bacteriana de la columna de agua

A partir de los datos obtenidos de las experiencias de sedimentación-resuspensión, se utilizó un modelo de regresión lineal para obtener posteriormente, las constantes cinéticas de desaparición (k) y los tiempos necesarios para que desaparezca el 90 % de las bacterias de la superficie acuosa (T_{90}) para ambos indicadores bacterianos en todas las matrices ensayadas. El modelo lineal ajustó satisfactoriamente los valores experimentales, habiéndose obtenido coeficientes de determinación R^2 mayores a 0,9 en la mayoría de los casos (Figura 3), con la sola excepción de *E. coli* en la matriz Aguas Termales con baja turbidez (M3) que presentó un valor de 0,8487 (Figura 3 f).

Es importante destacar el buen ajuste encontrado ya que indica que estos valores son confiables y robustos y pueden ser usados en modelos matemáticos que analizan el comportamiento de estas bacterias en ambientes acuáticos recreativos.

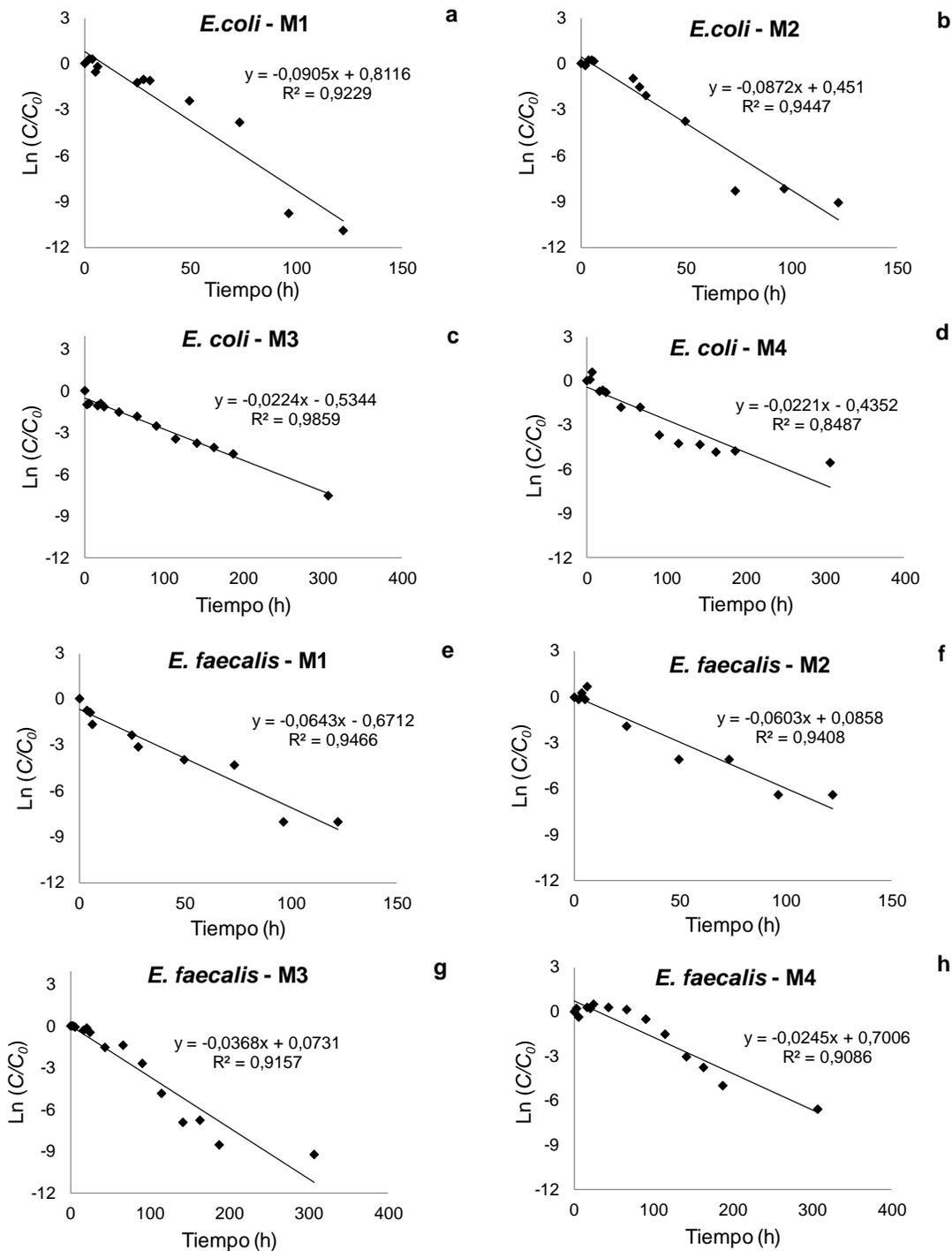


Figura 3. Cinética de desaparición (símbolos) de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) y ajuste lineal (línea continua) para el cálculo de constantes en: M1, Río La Caldera (a y e); M2, Río Vaqueros (b y f); M3, Río Arenales (c y g) y M4, Aguas Termales (d y h). C (UFC/100 ml) es la concentración de bacterias en el tiempo t (h) y C_0 (UFC/100 ml) la concentración de bacterias en el tiempo inicial (t_0).

Persistencia de *E. coli* y *E. faecalis* en las matrices ambientales

Los parámetros cinéticos obtenidos de la regresión lineal (Tabla 2) permitieron conocer e interpretar de manera cuantitativa y simplificada la persistencia de estos dos microorganismos en cada una de las matrices ambientales estudiadas. La persistencia es el tiempo en el que un microorganismo puede permanecer viable en el ambiente acuático [13]. Aunque esta característica depende de muchas variables, se puede mencionar como una de las más importantes la presencia de partículas sólidas. Como se dijo anteriormente, es posible que los microorganismos se adsorban a las partículas en suspensión, generalmente a las de menores tamaños, ya que les brindan protección y le permiten mantenerse viables por períodos más prolongados.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de desaparición por sedimentación y/o inactivación o muerte para *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* sembrados en cuatro matrices acuosas ambientales distintas. Constante cinética de desaparición (k) y tiempo necesario para que el 90 % de la población bacteriana desaparezca (T_{90}).

Matrices acuosas ambientales	<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	k (h ⁻¹)	T_{90} (h)	k (h ⁻¹)	T_{90} (h)
Río La Caldera (M1)	0,0905	25	0,0643	36
Río Vaqueros (M2)	0,0872	26	0,0603	38
Río Arenales (M3)	0,0224	103	0,0368	63
Aguas Termales (M4)	0,0221	104	0,0245	94

Para el caso de *E. coli* en M1 (Río La Caldera) y M2 (Río Vaqueros), el tiempo necesario para que se produzca la desaparición del 90% fue de 25 h y 26 h, respectivamente, presentando además valores de constantes de desaparición similares (Tabla 2). Esto reafirma lo dicho con respecto a que existen muchos otros factores además de la turbidez que pueden afectar la persistencia de las bacterias en agua.

Aunque *E. faecalis* mostró una desaparición más lenta de la superficie acuosa que *E. coli* evidenciada por los mayores valores de T_{90} tanto en M1 como en M2 (Tabla 2), al realizarse la resuspensión, el recuento de colonias de *E. coli* fue mayor (Figura 2 a). Probablemente la desaparición temporal de *E. coli* de la superficie de agua se debió principalmente a su sedimentación junto con los sólidos (persistiendo en el lecho), mientras que en el caso de *E. faecalis* su desaparición fue principalmente por inactivación y/o muerte.

Los valores de las constantes cinéticas de desaparición de *E. coli* tanto en M3 (Figura 2 c) como en M4 (Figura 2 d) fueron similares (Tabla 2). Sin embargo, al producirse la

resuspensión, solo reaparecieron en la matriz de alta turbidez (M3: Río Arenales), indicando mayor persistencia de estas bacterias en presencia de partículas sólidas.

El tiempo necesario para que el 90% (T_{90}) de *E. faecalis* desapareciera de la superficie acuosa fue mayor para la matriz de baja turbidez (M4: Aguas Termales) que para la de alta (M3: Río Arenales) con valores de 94 y 63 h, respectivamente. Sin embargo, al producirse la resuspensión, solo reaparecieron en la matriz de alta turbidez, corroborando nuevamente una mayor persistencia debido a la protección brindada por las partículas.

Al comparar el comportamiento de ambas bacterias, se pudo evidenciar que el tiempo necesario para que desaparezca el 90% de *E. coli* en el Río Arenales (M3) fue 1,6 veces mayor que para el de *E. faecalis* (Tabla 2), indicando una mayor persistencia en la superficie debida tal vez a las partículas en suspensión. En aguas termales no hubo casi diferencias plausibles en lo que respecta a la persistencia entre ambas bacterias, lo que se puede observar en la similitud de los parámetros cinéticos calculados (Tabla 2).

Muchos autores observaron que la presencia de sólidos suspendidos en el agua puede aumentar la velocidad de sedimentación de aquellos microorganismos adheridos a éstos ocasionado su rápida desaparición de la superficie acuosa [16]. Pero también dichas partículas pueden mantenerlos en suspensión por largos períodos, brindándoles protección frente a factores ambientales como tratamientos o inactivación por luz solar. Ambas situaciones les permiten persistir por mayores tiempos lo que en definitiva incrementa el riesgo de infección para las personas que hacen uso recreativo de estas aguas [16, 18, 30]. Con respecto a esto, algunos trabajos afirman que la persistencia de bacterias en el lecho es entre cien y mil veces mayor que en la columna de agua constituyendo así un importante reservorio de microorganismos [15, 34]. Esta capacidad de supervivencia de los microorganismos adheridos a sólidos lleva a pensar que la detección que se realiza normalmente en la columna de agua durante los monitoreos no se debe solamente a una contaminación reciente, sino que probablemente sea una combinación de ésta y el retorno hacia la superficie de aquellos que se encontraban en el lecho y reaparecen debido a una resuspensión [13, 15, 29] que puede haberse ocasionado por causas naturales o antropogénicas. Se deberá tener en cuenta esta información entonces para reestructurar los sistemas de monitoreo y los modelos de calidad de agua.

CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la persistencia de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, dos bacterias ampliamente utilizadas como indicadores de calidad de agua de uso recreativo, en diferentes matrices ambientales, con y sin turbidez.

Se pudo observar una mayor afinidad de *E. coli* a las partículas sólidas lo que se evidenció por la reaparición de colonias al producirse una resuspensión de las matrices acuosas ambientales que presentaban alta turbidez. No sucedió lo mismo con *E. faecalis*, cuyas

velocidades de desaparición fueron similares tanto en matriz de alta como de baja turbidez. Sin embargo, las diferencias en la persistencia entre marices con baja y alta turbidez, no fue marcada en los casos evaluados lo que podría estar indicando que otras características de las matrices acuosas influyen en la persistencia y supervivencia de los microorganismos en agua. Sin embargo, para poder afirmar esto, se requerirá un estudio más profundo. Por otro lado, al analizar solamente la turbidez, no se puede concluir a qué tamaño de partículas son más afines estas bacterias, por lo que sería necesario realizar ensayos de sedimentación-resuspensión con distintos tamaños de partículas (y concentraciones) conocidas y por separado.

Finalmente, es preciso remarcar la importancia que tiene contar con los valores calculados de las constantes cinéticas de desaparición de ambas bacterias, ya que estos podrán en un futuro ser incluidos en modelos de evaluación cuantitativa de riesgo microbiano y de calidad de agua. De esta manera se obtendrán resultados más realistas que permitirán tomar mejores decisiones a la hora de controlar o remediar ambientes de uso recreativo disminuyendo así el riesgo en la salud de los bañistas.

BIBLIOGRAFIA

[1] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, editor, “Global Outlook, data, however, refers to the year 2000”. Prepared by the Statistics Division. 2006. [Online]: <http://faostat.fao.org/Portals/Faostat/documents/pdf/world.pdf>

[2] Islam N., Sadiq R., Rodriguez M.J. y Francisque A., “Evaluation of source water protection strategies: a fuzzy-based model”, J Environ Manage; Vol. 121, pp. 191–201, 2013.

[3] WHO, World Health Organization, editor., “Guidelines for safe recreational water environments”. Vol 2. Swimming pools and similar environments. WHO press. Ginebra, Suiza Ira ed. 2006 [Online]: http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe2full.pdf

[4] OMS, Organización Mundial de la Salud, editor. “Estadísticas Sanitarias Mundiales”. WHO press, Suiza. 2012. [Online]: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ES_WHS2012_Full.pdf

[5] Ouattara N.K., Passerat J. y Servais P., “Faecal contamination of water and sediment in the rivers of the Scheldt drainage network”, Environ Monit Assess, Vol. 183 (1-4), pp. 243-257. 2011.

[6] GCRWQ, Guidelines for Canadian recreational water quality, editor. 3ra ed. Canadian Government Publishing Centre. Ottawa, Canada. 2012. [Online]: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/pdf/pubs/water-eau/guide_water-2012-guide_eau/guide_water-2012-guide_eau-eng.pdf

- [7] SRHN, Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, editor., “Desarrollos de niveles guías nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a *Escherichia coli*/Enterococos”. República Argentina. 2003. [Online]: <http://www.pnuma.org/agua-miaac/CODIA%20CALIDAD%20DE%20LAS%20AGUAS/MATERIAL%20ADICIONAL/PONENCIAS/PONENTES/Tema%205%20Niveles%20Guias%20Calidad%20de%20Aguas/NIVELES%20GUIA/4%20-%20Desarrollos/escherichia.pdf>
- [8] USEPA, United States Environmental Protection Agency, editor. “Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria (May 2002 draft)”. Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC (EPA-823 -B -02-003.2002. [Online]: <http://www.epa.gov/waterscience/standards/bacteria>
- [9] Marion J.W., Lee J., Lemeshow S. y Buckley T.J., “Association of gastrointestinal illness and recreational water exposure at an inland U.S. beach”, *Water Res*, Vol. 44(16), pp. 4796–4804. 2010.
- [10] Wiedenmann A., Krüger P., Dietz K., López-Pila J.M., Szewzyk R. y Botzenhart K. “A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal Enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages”, *Environ Health Perspect*, Vol. 114 (2), pp. 228–236. 2006.
- [11] Trento A.E. y Vinzon S.B., “Modelo de partículas para el transporte de sedimentos finos”, *Mec Comput*, Vol. 23, pp. 1357-1374. 2006.
- [12] Gao G., Falconer R.A. y Lin B., “Numerical modeling of sediment bacteria interaction processes in surface waters”, *Water Res*, Vol. 45(5), pp. 1951-1960. 2011.
- [13] Brookes J.D., Antenucci J., Hipsey M., Burch M.D., Ashbolt N.J. y Ferguson C., “Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs”, *Environ Int*, Vol. 30 (5), pp. 741-759. 2004.
- [14] Pourabadehei M. y Mulligan C.N., “Resuspension of sediment, a new approach for remediation of contaminated sediment”, *Environ Pollut*. Vol. 213, pp.63-75. 2016.
- [15] Chávez-Díaz L., Gutiérrez-Cacciabue D., Poma H.R., Rajal V.B., “Sediments quality must be considered when evaluating freshwater aquatic environments used for recreational activities” *Int J Hy and Environ Health*, Vol. 223 (1), pp. 159–170. 2020.
- [16] Kay D., Stapleton C.M., Wyer M.D., McDonald A.T., Crowther J.N., Jones P.K., Francis C., Watkins J., Wilkinson J., Humphrey H., Lin B., Yang L., Falconer R.A. y Gardner S., “Decay of intestinal enterococci concentrations in high-energy estuarine and coastal waters: towards real-time T90 values for modeling faecal indicators in recreational waters”, *Water Res*, Vol. 39(4), pp.655-667. 2005.
- [17] Chandran A., Varghese S., Kandeler E., Thomas A., Hatha M. y Mazumde A., “An assessment of potential public health risk associate with the extended survival of indicator

and pathogenic bacteria in freshwater lake sediments”, *Int J Hyg Envir Heal*. Vol. 214 (3), pp. 258–264. 2011.

[18] Poma H.R., Kundu A., Wuertz S. y Rajal V.B., “Data fitting approach more critical than exposure scenarios and treatment of censored data for quantitative microbial risk assessment”, *Water Res*, Vol. 154 (1), pp.45-53. 2019.

[19] Pote J., Haller L., Kottelat R., Sastre V., Arpagaus P. y Wildi W., “Persistence and growth of faecal culturable bacterial indicators in water column and sediments of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland”, *J Environ Sci (China)*, Vol. 21(1):62-69. 2009.

[20] Gutiérrez-Cacciabue, D., “Resistencia y persistencia de organismos patógenos en ambientes acuáticos de la Provincia de Salta-Sistemas para la mitigación y el control de la contaminación”. Tesis de doctorado en Ingeniería. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta. Argentina. 2013.

[21] Poma H.R., Gutiérrez-Cacciabue D., Garcé B., Gonzo E.E. y Rajal V.B., “Towards a rational strategy for monitoring microbiological quality of ambient waters”, *Sci Total Environ*, Vol. 433, pp. 98–109. 2012.

[22] Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W. y Greenberg A.E., “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, 21va edición. APHA, American Public Health Association, Washington, DC, 2005.

[23] Gutiérrez-Cacciabue D., Teich I., Poma H.R., Cruz M.C., Balzarini M. y Rajal V.B., “Strategies to optimize monitoring schemes of recreational waters from Salta, Argentina: a multivariate approach” *Environ Monit Assess*, Vol. 186 (12), pp. 8359-8380. 2014.

[24] EPA, Environmental Protection Agency, editor, “Method 1603: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC)” EPA-821-R-09-007. Washington, DC. 2009 [Online]: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_1603_2009.pdf

[25] EPA, Environmental Protection Agency, editor, “Method 1106.1: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus-Esculin Iron Agar (mE-EIA)”. EPA-821-R-02-021 Washington DC. 2009 [Online]: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_1106-1_2009.pdf.

[26] Chick H., “The process of disinfection by chemical agents and hot water”, *J Hygiene Cambridge*, Vol. 10, pp. 237-286. 1910.

[27] Chapman D., editor, “Water quality assessments-A guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring”. 2da ed. WHO, World Health Organization. E&FN Spon. Chapman & Hall. Cambridge, UK. 1996 [Online]: http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/watqualassess.pdf.

[28] USEPA, United States Environmental Protection Agency, “Recreational Water Quality Criteria”. Office of Water. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington, DC. 2012. [Online]: <https://www.epa.gov/sites/production/.../recfactsheet-2012.pdf>

[29] Gutiérrez-Cacciabue D., Cid A.G. y Rajal V.B., “How long can culturable bacteria and total DNA persist in environmental waters? The role of sunlight and solid particles”, *Sci Total Environ*, Vol. 539, pp. 494–502. 2016.

[30] Auer M.T. y Niehaus SL., “Modeling fecal coliform bacteria-field and laboratory determination of loss kinetics” *Water Res*, Vol. 27 (4), pp. 693-701. 1993.

[31] Soupir M.L., Mostaghimi S. y Dillaha T., “Attachment of *Escherichia coli* and enterococci to particles in runoff”, *J Environ Qual*, Vol. 39 (3), pp.1019-1027. 2010.

[32] Gin, K.Y.H. y Goh S.G., “Modeling the effect of light and salinity on viable but nonculturable (VBNC) *Enterococcus*”, *Water Res*, Vol. 47, 3315–3328. 2013.

[33] Domínguez M.S., Escalante A.H., Folabella A.M. y Zamora A.S. “Selective grazing by protists upon enteric bacteria in an aquatic system”, *Rev Argent Microbiol*, Vol. 44 (1), pp. 43–48. 2012.

[34] Davies C.M., Long J.A.H., Donald M. y Ashbolt N.J., “Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments”, *Appl Env Microbiol*, Vol. 61, pp. 1888–1896. 1995.