

Enfoques Interdisciplinarios para la Sustentabilidad del Ambiente Conservación y Degradación de Recursos Ecosistemas Terrestres y Humedales

Estudio de la diversidad bacteriana en un arroyo contaminado del conurbano bonaerense.

Study of bacterial diversity in a polluted stream in the metropolitan area of Buenos Aires

J.R. Neyra Recky^a, M.L. Elordi^b, G.A. Torres Tejerizo^a y A.A. Porta^b

^a Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) CONICET-UNLP La Plata, Argentina. jael_neyra@hotmail.com; gatt@biol.unlp.edu.ar

^b Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA) Fac. Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina. aporta@quimica.unlp.edu.ar; lucilaelordi@quimica.unlp.edu.ar

Resumen

La contaminación de los recursos hídricos resulta uno de los problemas más importantes de los países en desarrollo. Regionalmente, el arroyo Las Piedras presenta graves problemas de contaminación. Al carecer de servicios de infraestructura básica, sus habitantes se encuentran expuestos sistemáticamente a enfermedades, debido a la falta de condiciones higiénico-sanitarias.

En este trabajo se realizó la caracterización física y química del arroyo Las Piedras, situado en el conurbano bonaerense, donde detectamos en el agua niveles que superaron los valores guía establecidos para un uso recreativo como en el caso del fósforo total, amonio, grasas y aceites. A su vez, se evaluó la diversidad bacteriana asociada a microorganismos patógenos y no patógenos, entre ellos microorganismos intestinales presentes tanto en agua como en sedimento. El mismo se llevó a cabo realizando una extracción de ADN total de la comunidad microbiana, la amplificación del 16s y la posterior secuenciación de la muestra por la tecnología de Illumina. Del análisis metagenómico del agua, un 11% de las especies detectadas han sido asociadas a diversos procesos patogénicos en el hombre, mientras que en el sedimento este número es de 6%. Los elevados niveles de contaminación detectados dejan en claro que la población que habita a lo largo de los márgenes del arroyo se encuentra ante un elevado riesgo sanitario.

Palabras clave: Agua superficial, Sedimentos, Diversidad bacteriana, Patógenos intestinales.

Introducción

En las últimas décadas ha habido una creciente preocupación mundial por los efectos en la salud pública atribuibles a la contaminación del medio ambiente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de una cuarta parte de las enfermedades que enfrenta la humanidad hoy en día se producen debido a la exposición prolongada a la contaminación ambiental¹.

La contaminación de los recursos hídricos resulta uno de los problemas más importantes en los países en desarrollo debido a la gran variedad y al desconocimiento de las fuentes de contaminación, y también a la carencia de medios de las instituciones públicas para remediarla. La situación es dinámica y, muchas veces, difícilmente predecible. Lo principal, sin embargo, es saber en qué medida todos estos problemas de desarrollo afectan a las personas de bajos recursos y a los sectores más vulnerables. Regionalmente, el arroyo Las Piedras

presenta graves problemas de contaminación, particularmente en las zonas media y baja de la cuenca, y una ocupación desordenada del suelo sobre sus márgenes inundables¹⁻³.

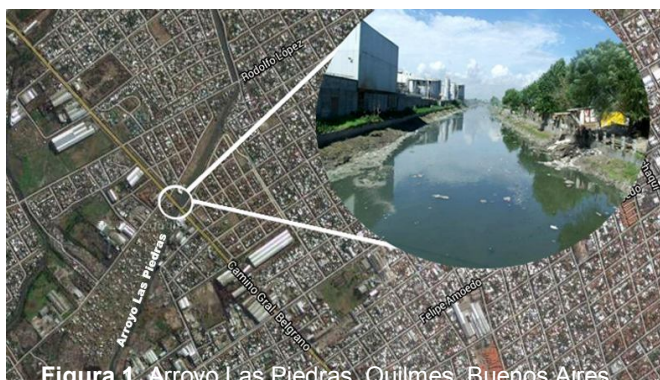
Se reconocen básicamente dos tipos de contaminación. La contaminación fecal, que se origina por el vertido de aguas de desecho de origen doméstico sin tratamiento, hecho usual en el conurbano bonaerense y particularmente en el área de estudio. Por otro lado, la contaminación química de las aguas superficiales se origina por vuelcos directos clandestinos, tratamiento inadecuado de efluentes industriales y mal diseño de los sitios de descarga de los parques industriales². Las aguas de inundación, que pueden contener bacterias patógenas provenientes de desechos humanos y animales suponen un importante riesgo sanitario, no sólo por su ingesta sino también por contacto directo a través de la piel.

Por tanto, el control de la calidad microbiológica del agua requiere de análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos. Estos agentes, involucrados en la transmisión hídrica son las bacterias, virus y parásitos, que pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simples hasta casos fatales de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. La transmisión hídrica es solo una de las vías, pues estos agentes patógenos también pueden ser transmitidos a través de alimentos, de persona a persona debido a malos hábitos higiénicos y de animales al hombre, entre otras rutas de transmisión²⁻³.

El objetivo de este trabajo fue determinar las características microbiológicas, físicas y químicas del arroyo Las Piedras, y evaluar su diversidad bacteriana considerando los factores que afectan la calidad de sus aguas, como los basurales clandestinos, las descargas de aguas residuales domiciliarias y/o de efluentes industriales.

Materiales y Métodos

El arroyo Las Piedras atraviesa una amplia zona del sur del conurbano bonaerense. Conjuntamente con el arroyo San Francisco, forman parte de la cuenca Sur del arroyo Santo Domingo, el cual desemboca en el Río de La Plata y abarca un área aproximada de 150 Km² con una extensión de 23 Km. El arroyo Las Piedras recorre parte de los partidos de Avellaneda, Quilmes, Florencio Varela y Almirante Brown⁴ (Figura 1). Durante el mes de marzo de 2015 se colectaron en el arroyo Las Piedras muestras de agua en recipientes estériles y de sedimento con una draga van Veen. Todas las muestras se extrajeron entre las 9:00 y 14:00 h y se mantuvieron refrigeradas a 4-6 °C hasta el momento de su procesamiento.



Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron fueron: pH, Temperatura, Oxígeno Disuelto, Sólidos totales disueltos, Conductividad (*in-situ*/Sonda multiparamétrica HANNA); Turbiedad, Cloruros, Nitratos, Nitrógeno amoniacal, Fósforo total, Demanda bioquímica de oxígeno y Demanda química de oxígeno mediante metodologías estandarizadas internacionalmente⁵. Se determinó también

la densidad bacteriana de Coliformes totales y fecales mediante la técnica de Tubos Múltiples (NMP)⁵. Para determinar la diversidad bacteriana presente en las muestras de agua y sedimento del arroyo Las Piedras se llevaron a cabo la extracción de ADN y la evaluación de la calidad del mismo para su posterior procesamiento y secuenciamiento.

Para preparar las muestras, se realizaron centrifugaciones seriadas a 15.344 g durante 15 min a 8°C de las muestras de agua utilizando una centrifuga Super speed Sorvall™ RC 6 Plus, empleando un volumen total de 4,4 L de agua y obteniéndose 1,08 g de muestra, de dicha muestra se utilizaron 0,16 g para la extracción de ADN.

En el caso del sedimento se procedió directamente a partir del mismo, sin centrifugaciones previas, utilizando 0,51 g para la extracción.

Posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante la utilización de un kit comercial denominado Fast DNA SPIN Kit for Soil, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La cuantificación y determinación de pureza fue llevada a cabo mediante la medición de absorbancia a 260/ 280nm en espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000); simultáneamente se realizó un análisis cualitativo a través de una corrida electroforética de las muestras en un gel de agarosa 1%.

Usualmente, la extracción de ADN de muestras complejas puede, a su vez, dejar contaminaciones que interfieren con las posteriores técnicas moleculares. Para asegurarnos que el ADN obtenido tenía una calidad aceptable para el posterior secuenciamiento se procedió a realizar una amplificación del 16s mediante reacciones de polimerasa en cadena a partir tanto de las muestras de agua como de sedimento.

Para ello, se utilizó el siguiente ciclado para la mezcla de reacción: desnaturalización a 94 °C durante 4 min seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 20 s, 54 °C durante 20 s y 72 °C durante 80 s, seguido por una elongación final de 3 min a 72°C. Empleando el *primer forward* universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), M=A+C y el *primer reverse* universal 1385R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), Y=C+T⁶. A partir del producto amplificado se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 1%.

Para la secuenciación por Illumina, la región variable V4 del 16S rRNA fue amplificada por PCR con los *primers* 515/806 modificados con una secuencia adicional en los *primer* para su posterior identificación (*barcode*). Se realizaron 30 ciclos de PCR utilizando HotStar Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen, USA) bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 3 minutos, seguido por 28 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 53 °C por 40 segundos y 72 °C por 1 minuto, finalmente, se realizó un paso final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa 2%. Las muestras fueron mezcladas en proporciones equimolares y purificadas utilizando "Ampure XP beads". Con estos productos purificados se realizaron las bibliotecas de ADN siguiendo el protocolo "*Illumina TruSeq DNA library preparation protocol*". La secuenciación fue realizada en un secuenciador Illumina MiSeq⁷.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas siguiendo procedimientos bioinformáticos estandarizados (*pipeline*) de MR DNA (MR DNA, Shallowater, TX, USA). Las mismas fueron unidas, se eliminaron los *barcodes* y fueron evaluadas en su calidad. Las secuencias cuya calidad no era satisfactoria fueron también removidas. Luego, se compararon las secuencias con base de datos de 16s para generar las unidades taxonómicas operativas (*Operational taxonomic units*, OTUs) y

remover las quimeras. Las "OTUs" fueron definidas según un máximo de 3% de divergencia (97% de similitud). Las OTUs fueron clasificados taxonómicamente mediante BLASTn utilizando como base de datos la base de datos derivadas de "GreenGenes", "RDPII" y "NCBI"⁸.

Resultados y Discusión

Evaluación fisicoquímica

Según los resultados obtenidos respecto a los parámetros físicos y químicos (Tabla 1) en las muestras de agua (LPA) del arroyo Las Piedras podemos observar que si bien no existe un nivel guía para la concentración del oxígeno disuelto para aguas de uso recreativo, esta resulta extremadamente baja en cuanto al nivel establecido para la protección de la vida acuática (5 mg/l).

Tanto la concentración de sólidos disueltos totales como la conductividad presentan valores altos, los cuales reflejan una elevada concentración de sales disueltas en el agua. Los altos valores de DQO dan cuenta de un alto grado de contaminación por descargas de origen cloacal y/o industrial.

Cabe destacar que el sitio de muestreo se encuentra ubicado aguas abajo de una importante grasera de la zona, lo cual se manifiesta también en la elevada concentración de grasas y aceites (Tabla 1).

Los valores observados de Fósforo total y Amonio sobrepasan ampliamente los niveles guía establecidos por el ADA, revelando una gran cantidad de nutrientes disponibles para el crecimiento bacteriano. El resto de los parámetros analizados se encuentra por debajo de los valores guía establecidos.

Los niveles de Coliformes totales y fecales resultaron $>10^5$ NMP.100 ml⁻¹, superando ampliamente los límites para aguas recreacionales (126NMP.100 ml⁻¹).

Parámetro	LPA	ADA-recreación*
pH (u de pH)	6,64	6,5-8,5
Temperatura agua (°C)	26,8	**
Temperatura ambiente (°C)	29,2	**
% Oxígeno Disuelto (%)	28,5	**
Conductividad (µS)	1291	**
Cloruros (mg/l)	76,9	**
Demanda química de oxígeno (mg/l)	118,4	50
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/l)	5,4	10
Fosforo Total (mg/l)	1,6	0,025
Fosfatos (mg/l)	4,9	**
Sólidos Disueltos Totales (mg/l)	661	**
Nitratos (mg/l)	10,6	125
Turbiedad (mg/l)	4,5	100
Amonio (mg/l)	5,7	0,5
Aceites y Grasas (mg/kg)	123,4	**

Tabla 1. Resultados de los parámetros físico-químicos (* Niveles de referencia de calidad de agua dulce para uso recreativo en la zona de uso exclusivo del Río de La Plata y su Frente Marítimo. Autoridad del Agua (ADA Resol.042/2006).** Para dichos parámetros la Autoridad competente no determina valores guía pertinentes.)

Determinación de la diversidad microbiológica

Con respecto a la extracción del ADN a partir de las muestras de agua (LPA) y sedimento (LPS) del arroyo en estudio, a continuación se muestra el gel obtenido por electroforesis (Fig. 2) así como también los resultados arrojados por el NanoDrop (Tabla 2).

Tabla 3. Resultados obtenidos en el NanoDrop

Sample ID	ng/ul	260/280
LPA	279,42	1,35
LPS	300,17	1,84

A partir de los datos obtenidos en la corrida electroforética (Fig. 2) puede observarse que la

extracción de ADN resultó exitosa. Los valores obtenidos en la Tabla 2 revelan que la concentración y pureza del ADN es suficiente para continuar con su posterior secuenciamiento.

Luego de confirmar cualitativamente la amplificación del gen del 16s, por la presencia de una banda de aproximadamente 1300-1400 pares de bases en una corrida electroforética realizada en un gel de agarosa 1%, las muestras fueron enviadas a MR DNA, donde procedieron a realizar las bibliotecas y su posterior pirosecuenciamiento como se detalla en Materiales y Métodos.

Según los resultados que arrojó tal secuenciación y la posterior clasificación de las lecturas, pudimos diferenciar bacterias patógenas asociadas a enfermedades en humanos, ya sean de origen hídrico, alimentario o respiratorio, de aquellas que no lo son. Un 11% de las secuencias identificadas en agua corresponden a bacterias patógenas mientras que un 6% en sedimentos.

Se observó que el porcentaje de bacterias patógenas en el agua resultó un 5% mayor que en el sedimento del arroyo.

A su vez, evaluamos los géneros bacterianos más comunes que presentan especies patógenas (Tabla 3). En ella, se destaca claramente el mayor porcentaje de *Arcobacter* spp. (10,691%) en agua, respecto al resto de los patógenos presentes. Mientras que en el sedimento se destacan géneros como *Clostridium* spp. (2,668%) y *Leptospira* spp. (1,802%). Cabe mencionar que en cercanías del sitio muestreado se diagnosticaron, en febrero 2015, casos de leptospirosis en adultos que habían estado en contacto con agua y/o sedimento del arroyo. La Figura 4 muestra la distribución de la diversidad bacteriana hallada en ambas matrices analizadas, observándose una mayor diversidad en el sedimento respecto del agua, sin embargo, vale considerar que la concentración bacteriana también resultó superior en el sedimento



Figura 2. Corrida electroforética a 105V, 0,07 A y 7W. Patrón Fago λ cortado con HindIII.

Tabla 3. Porcentaje de patógenos más comunes en agua y sedimento del arroyo Las Piedras

LPA (%)	Patógenos más comunes	LPS (%)
0,001	<i>Escherichia</i> spp.	0,000
0,026	<i>Shigella</i> spp.	0,007
0,089	<i>Burkholderia</i> spp.	0,171
0,001	<i>Campylobacter</i> spp.	0,002
0,037	<i>Mycobacterium</i> spp.	0,816
0,006	<i>Legionella</i> spp.	0,018
0,025	<i>Leptospira</i> spp.	1,802
0,258	<i>Clostridium</i> spp.	2,668
0,009	<i>Salmonella</i> spp.	0,002
0,004	<i>Vibrio</i> spp.	0,005
10,691	<i>Arcobacter</i> spp.	0,332

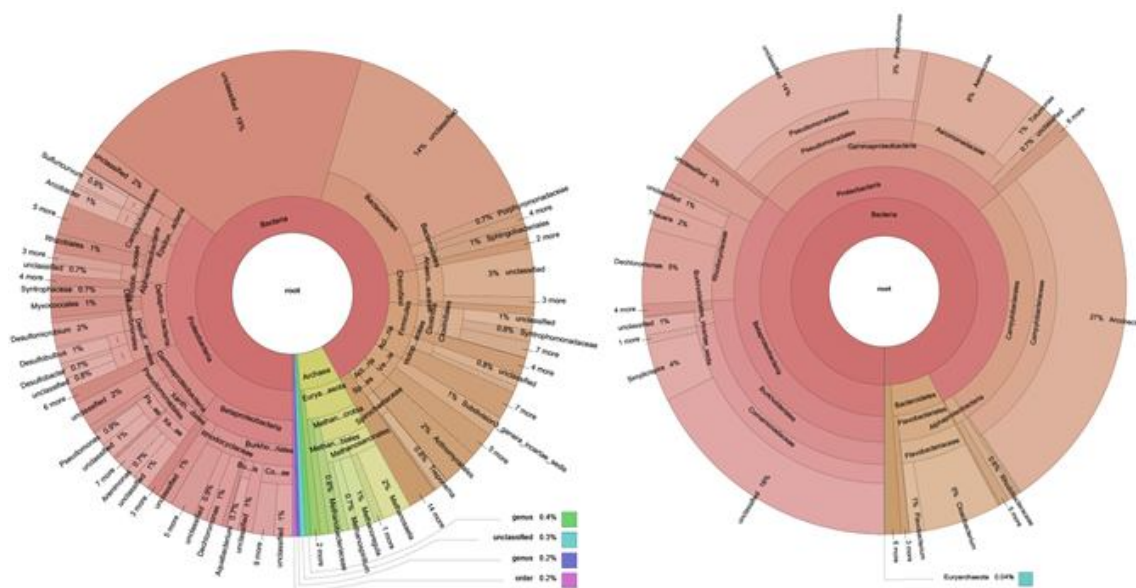


Figura 4. Distribución de la diversidad bacteriana hallada en a. sedimento, b. agua.

Conclusiones

Como hemos mencionado, los altos niveles de sólidos disueltos y grasas encontrados, además del elevado número de bacterias coliformes totales y fecales) se corresponden con el contexto ambiental del sitio monitoreado, donde se ubica una importante grasera a la vera del arroyo que descarga sus efluentes al mismo, un asentamiento que fue creciendo exponencialmente en los últimos años y que vierte sus desechos domésticos (aguas blancas y negras). A su vez, mediante el uso de herramientas metagenómicas hemos encontrado que un 10% de las bacterias en agua podrían ser agentes causales de enfermedades en la población que habita los márgenes del arroyo. El uso de herramientas metagenómicas en estudios ambientales proporciona información que contribuye a definir ecosistemas, conocer el potencial que tienen a nivel biotecnológico los microorganismos presentes, establecer perfiles de ambientes impactados y, como hemos visto, identificar posibles agentes causales de enfermedades.

Referencias

- 1- OPS. Desarrollo sostenible y salud ambiental. En: Salud en las Américas 2007. 3 (2007).
- 2- Kjellstrom T., Lodh M., McMichael et al. Air and Water Poll.: Burden and Strategies for Control. Disease Control Priorities in Developing Countries, 2nd ed., 43 (2006) 817-832.
- 3- Masciadri V. "Ciudadanía y salud ambiental en la población de Quilmes residente en la cuenca 1 de los arroyos S. Francisco y Las Piedras", X Jor. Arg. de Estudios de Población S. Fdo. de Catamarca (2009) 1-28.
- 4- Elordi M, Digirónimo M., Porta A. Eval. calidad microbiológica de aguas de los arroyos Las Piedras-S. Francisco considerando el nivel de cobertura sanitaria de la población adyacente. 7mo Cong. Medio Ambiente AUGM UNLP, (2012).
- 5- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th Ed., 1998. Amer. Water Works Assoc., Amer. Public Health Assoc., Amer. Water Works Assoc. and Water Environ. Fed.
- 6- Feng B-W, Li X-R, et al. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. FEMS MicrobiolEcol 70 (2009) 236–248.
- 7- www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA.
- 8- DeSantis T., Hugenholtz P. et al., chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB Appl. Environ Microbiol. (2006) 72: 5069-72.