



## Estudio de la contaminación microbiológica de las cachimbas del Cabo Polonio: efecto del tiempo de residencia del agua



**Martina Soumastre Mezquida**

Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica.  
Facultad de Ciencias.

**Tutor: Dra. Claudia Piccini**

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable  
Departamento de Microbiología

# ÍNDICE

---

	<i>Página</i>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Rol de la comunidad bacteriana heterótrofa en los ecosistemas acuáticos .....	<b>6</b>
Composición y diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas acuáticos .....	<b>8</b>
Relevancia del agua como recurso natural y problemáticas asociadas a su contaminación .....	<b>10</b>
Coliformes totales y fecales: microorganismos indicadores de contaminación microbiológica del agua .....	<b>12</b>
Técnicas microbiológicas tradicionales empleadas para la determinación de coliformes.....	<b>13</b>
Técnicas moleculares para la determinación de coliformes .....	<b>14</b>
La viabilidad celular y su importancia en el monitoreo de la calidad microbiológica del agua .....	<b>16</b>
Microscopía de Fuerza Atómica: una alternativa para conocer la fisiología bacteriana .....	<b>18</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	
Sitio de estudio .....	<b>20</b>
Antecedentes específicos del sitio .....	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general .....	<b>23</b>
Objetivos específicos .....	<b>24</b>

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Estrategia y diseño experimental .....	24
Cuantificación de la abundancia de <i>E. coli</i> mediante DOPE-FISH .....	26
Determinación de la concentración de materia orgánica particulada y sólidos en suspensión .....	26
Viabilidad celular .....	27
Análisis de la abundancia y composición de la comunidad bacteriana mediante CARD-FISH .....	27
Cuantificación de las bacterias al microscopio de epifluorescencia .....	28
Evaluación de la validez del empleo de yoduro de propidio como indicador de viabilidad celular .....	29
Análisis estadístico .....	29

## **RESULTADOS**

Cuantificación de la abundancia de <i>E.coli</i> mediante DOPE-FISH .....	30
Determinación de la concentración de materia orgánica y sólidos en suspensión en el agua del microcosmo .....	32
Determinación del estado de viabilidad celular de la población de <i>E.coli</i> .....	32
Determinación de la composición de la comunidad bacteriana .....	34
Evaluación de la validez del empleo de yoduro de propidio como indicador de viabilidad celular .....	36

## **DISCUSIÓN**

Efecto del tiempo de residencia del agua sobre la abundancia de la población de <i>Escherichia coli</i> .....	38
Estudio de la viabilidad bacteriana mediante una técnica alternativa al recuento en placa .....	39
Evaluación de células teñidas con yoduro de propidio mediante MFA .....	40

Efecto del tiempo de residencia del agua sobre la dinámica de la comunidad bacteriana .....	41
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>APORTES A LA GESTIÓN DEL AGUA DE LAS CACHIMBAS EN EL</b>	
<b>CABO POLONIO .....</b>	<b>43</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>45</b>
<b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

---

El Área protegida Cabo Polonio conserva características representativas de paisaje natural de la costa uruguaya. Uno de los impactos antropogénicos que tiene más repercusión se relaciona con la construcción de viviendas cuyos pozos sépticos no cumplen con las regulaciones, localizándose a pocos metros de distancia de las fuentes de agua dulce sub-superficial (cachimbas). La hipótesis de este trabajo se basa en que debido a las características del terreno (dunas de arena) el intercambio de agua contaminada con coliformes fecales y materia orgánica puede verse favorecido, afectando la calidad del agua de las cachimbas. Con el fin de evaluar si el agua que ingresa a las cachimbas desde las capas subsuperficiales tiene su origen en los pozos sépticos cercanos, en este trabajo se analizó la dinámica de una población de *E. coli* en dos condiciones de tiempo de residencia del agua mediante una aproximación experimental. Se realizaron microcosmos conteniendo agua de cachimba a la que se inoculó una cepa de *E. coli* de laboratorio y a las 2, 4 y 8 horas de incubación se extrajo 1/10 del volumen, el que se sustituyó por el mismo volumen de agua de la cachimba prefiltrada por 0,22  $\mu\text{m}$  (remoción). Por otro lado, se realizó un control al que no se le extrajo agua (estático). La abundancia relativa de las bacterias inoculadas, así como la concentración de materia orgánica y la estructura del ensamblaje bacteriano se analizaron a las 0, 2, 4 y 8 horas de incubación en cada tratamiento. Los métodos empleados para determinar la abundancia relativa de *E. coli* en los tratamientos fueron FISH usando una sonda específica combinado con una tinción de viabilidad (ioduro de propidio). Se buscó de esta manera una alternativa a los métodos clásicos basados en cultivo y número más probable. Se observó que en el tratamiento remoción el inóculo de *E. coli* aumentó su abundancia relativa, comportándose como si se tratara de un cultivo continuo y sugiriendo la entrada de nutrientes. Por otro lado, en el tratamiento estático, si bien la población de *E. coli* aumentó significativamente a las 4 h de incubación, luego declinó hacia el final de la incubación hasta alcanzar abundancias cercanas a la inicial. Los tratamientos realizados no indujeron cambios en el ensamblaje bacteriano, aunque se observaron variaciones dentro de cada tratamiento. Todos los grupos analizados aumentaron significativamente su abundancia relativa entre las 2 y 4 h de incubación y la mantuvieron hasta el final del experimento, excepto Alphaproteobacteria, que disminuyó hacia el final. El grupo que mostró menor abundancia relativa fue Actinobacteria. En cuanto a la concentración de materia orgánica particulada, en el tratamiento remoción se registró una disminución a medida que la abundancia de *E. coli*, Betaproteobacteria y Bacteroidetes aumentó, sugiriendo su consumo por estos grupos. Los resultados de viabilidad resultaron llamativos, ya que el número de células no viables mostró la misma tendencia que las viables en ambos tratamientos, lo cual llevó a cuestionar el colorante empleado. Para dilucidar si el ioduro de propidio efectivamente indica células con su viabilidad comprometida se obtuvieron imágenes de microscopía de fuerza atómica. En éstas se observó que las muestras con mayor porcentaje de células no viables presentaban características descritas por otros autores como daño en la pared celular. En el trabajo se discuten las implicancias de estos hallazgos y se cuestiona el empleo de ioduro de propidio como indicador de viabilidad celular.

## **Agradecimientos...**

En primer lugar quiero agradecer a Claudia, por ser mi tutora, por enseñarme las técnicas y herramientas para comenzar a trabajar en Ecología microbiana acuática. Por su dedicación durante este tiempo de trabajo.

A Pablo, por permitirme ser parte del equipo de trabajo del Dpto. de Microbiología.

A Luis. A, por ayudarme con la determinación de materia orgánica.

A Gonzalo. R, por los intentos con el microscopio de fuerza atómica.

A la ANII y al grupo CSIC-Ecología Funcional Acuática.

A la colonia, por las tardes de trabajo compartidas, por sus consejos y experiencias... En especial a Germán, Gaby, Paula y Sofi.F.

A mi familia. Especialmente a mi mamá, por su esfuerzo y sacrificio todos estos años que me permitieron estudiar lo que me gusta. Y por creer en mí...

A mi hermana y amiga del alma. Por creer en mí y alegrarse de mis logros como si fuesen propios.

A mi papá.

A mis primas (mis segundas hermanas), a mi abuela y mis tías, que siempre están.

A mis amigas, a las que están acá y a las que de a poquito se volvieron, por compartir muchísimas cosas juntas.

A mis compañeras y amigas de carrera: Se, Romi, Niki, Majo, Clau, Lu, Gaby, Pau; porque con cada una compartí etapas diferentes y son muy especiales para mí.

A Nelly, a José y a Ramiro, por recibirme en su familia con mucho cariño y ayudarme siempre.

A Guille, por su amistad y cariño todos estos años.

## INTRODUCCIÓN

---

### **Rol de la comunidad bacteriana heterótrofa en los ecosistemas acuáticos**

Las bacterias son consideradas los microorganismos más antiguos de la Tierra. Esto tiene como consecuencia que hayan logrado colonizar todo tipo de ambientes (agua, suelo, aire, plantas, animales), explotando un sinnúmero de sustancias inorgánicas y orgánicas. Por tanto, su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (C, N, P, S) como remineralizadores de la materia orgánica (MO) resulta vital en todos los ecosistemas del planeta (Madigan et al., 2004). Generalmente viven en comunidades, en asociaciones biológicas que les permiten llevar a cabo el intercambio de materiales entre sus pares.

En los ecosistemas acuáticos, las abundancias bacterianas varían entre  $10^4$ - $10^6$  células por mililitro (Azam et al., 1983), dependiendo del estado trófico de los mismos. Las bacterias acuáticas son las responsables de gran parte de la respiración aeróbica del sistema y participan en la circulación de la materia (nutrientes) y la energía (Cotner et al., 2002). La importancia relativa de las bacterias en tales flujos se maximiza en los ecosistemas de baja productividad (oligotróficos), como los marinos.

Las bacterias fotosintéticas (autótrofas) constituyen una fracción importante de los productores primarios (PP) (Pomeroy et al., 2007), mientras que las heterótrofas son las responsables de remineralizar la materia orgánica disuelta (Azam et al., 1983) y reciclar elementos como nitrógeno, fósforo y carbono inorgánico volviéndolo disponible para los PP. El proceso de remineralización de la materia orgánica resulta fundamental en el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en estos ecosistemas (Azam et al., 1983).

En el caso de las bacterias planctónicas, su metabolismo se sustenta principalmente del carbono orgánico disuelto producido por los PP (Cole et al., 1982; Cole et al., 1988). Se considera que las bacterias heterótrofas son capaces de procesar entre el 10 y el 50% del carbono fijado por éstos a través de la respiración, producción de biomasa nueva e hidrólisis exoenzimática (Azam et al., 1983). Además, en los sistemas acuáticos que reciben un aporte importante de materia orgánica alóctona, la producción secundaria bacterioplanctónica puede llegar a igualar o incluso superar a la producción primaria fitoplanctónica (Cotner et al., 2002). La mayor parte de la materia orgánica presente en la columna de agua incluye moléculas complejas y de gran tamaño, por lo que generalmente no está biodisponible para las bacterias heterótrofas. Sin embargo, estas bacterias logran asimilarla a partir de la síntesis de enzimas extracelulares (sobre sus paredes celulares o libres) (Williams et al., 1998).

Durante años se propuso que el papel principal de las bacterias en los ecosistemas acuáticos era exclusivamente la descomposición de la materia orgánica. El término descomposición se refiere a la desintegración de materiales orgánicos de origen animal, microbiano o vegetal (Álvarez, 2005) para producir compuestos de bajo peso molecular que posteriormente se oxidan hasta las formas inorgánicas simples que los constituyen ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); etapa que se conoce como mineralización (Wetzel y Likens, 1991 en Álvarez,

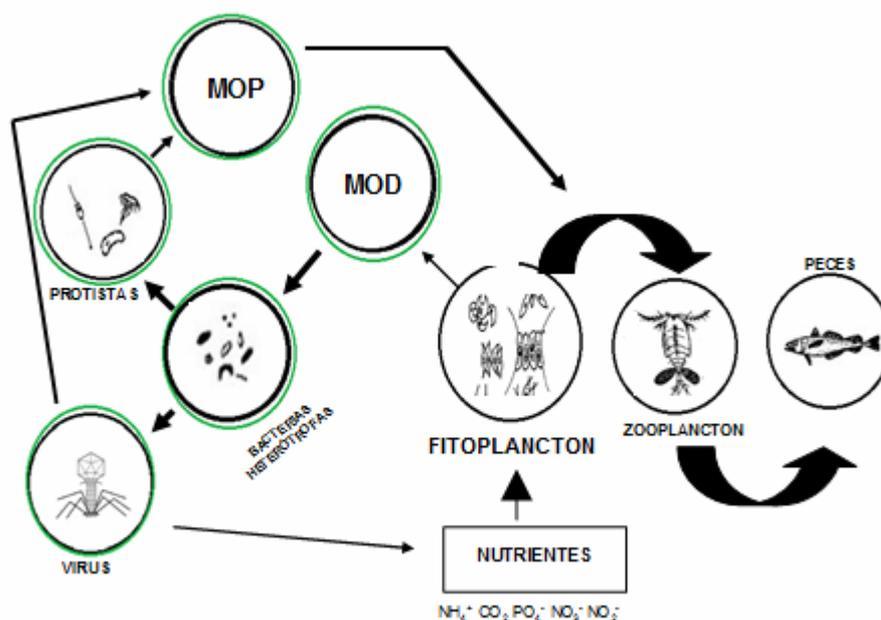
2005). En la década del 70' el modelo propuesto por Sheldon basado en el tamaño que tienen las partículas en la columna de agua explicaba el rol de las bacterias en la misma (Azam et al., 1983). Según dicho modelo los organismos tienden a utilizar partículas cuyo tamaño es un orden de magnitud inferior al suyo (Sheldon et al., 1972) y en este sentido, se propuso que la materia orgánica disuelta (MOD) liberada por el fitoplancton es utilizada por las bacterias heterótrofas (0,3-1  $\mu\text{m}$ ) para crecer.

En la década del 80' a partir del modelo desarrollado por Sheldon en el año 1972 Azam y colaboradores propusieron el término bucle microbiano (*microbial loop*) para explicar la participación de las bacterias heterótrofas en la trama trófica acuática (Azam et al., 1983). El bucle microbiano supone que gran parte de la producción primaria no es consumida directamente por los organismos herbívoros, sino que es aprovechada por las bacterias heterótrofas que la convierten en biomasa bacteriana y la hacen circular hacia niveles tróficos superiores (Figura 1). Esta transferencia de materiales y energía ocurre a través de interacciones tróficas y se considera que el comportamiento sumamente dinámico del bucle microbiano es el resultado de varias de estas interacciones, principalmente comensalismo, competencia y depredación (Azam et al., 1983). Por ejemplo, la energía liberada por el fitoplancton en forma de materia orgánica disuelta (MOD) es captada por las bacterias heterótrofas (comensalismo). Éstas son predadas por protistas (flagelados y ciliados heterótrofos) y estos últimos a su vez, por componentes del microzooplancton (depredación) de manera que la energía retorna a la trama trófica clásica (fitoplancton  $\rightarrow$  zooplancton  $\rightarrow$  peces) en forma de materia orgánica particulada (MOP) (Azam et al., 1983; Pomeroy et al., 2007).

Entonces, el crecimiento bacteriano puede ser regulado por los procesos *bottom-up* (restricción por nutrientes) y *top-down* (restricción por depredadores) (Williams et al., 2008). Por ejemplo, en los ecosistemas acuáticos oligotróficos la limitación por un tipo particular de nutriente o por varios de ellos, puede fijar el crecimiento bacteriano del sistema, lo que a su vez regulará la biomasa de las especies bacterívoras (Williams et al., 2008). En el caso del bacterioplancton heterótrofo la disponibilidad de nutrientes orgánicos puede determinar el nivel de crecimiento del mismo. Esto se conoce como control *bottom-up*. Por otra parte, el efecto *top-down* se refiere al proceso por el cual los depredadores controlan las abundancias de los organismos de niveles tróficos inferiores. En el caso del bacterioplancton esta regulación es ejercida principalmente por protistas (Williams et al., 2008). Se ha descrito que algunos microorganismos tienen la capacidad de percibir la presencia de predadores y cambiar rápidamente su morfología, por ejemplo a través de la formación de filamentos (Nold y Zwart, 1998; Pernthaler, 2005) para evadirlos. Asimismo, muchas bacterias han desarrollado otros mecanismos de evasión de la depredación como ser la liberación de toxinas, la generación de señales de comunicación como forma de alerta, la formación de exopolímeros sobre su superficie, de modo que se vuelven menos palatables para los depredadores (Pernthaler, 2005).

Otro factor biológico que regula la distribución de los microorganismos en los ambientes acuáticos son las infecciones virales (Weinbauer y Höfle, 1998). Los eventos de infección viral y la posterior lisis de las células bacterianas son muy frecuentes en los sistemas acuáticos naturales (Fuhrman y Suttle, 1993). Por lo tanto, los virus también ocupan un papel

clave en el bucle microbiano al contribuir a la liberación de nutrientes inorgánicos y MO a la trama trófica acuática. Además, junto a la depredación por protistas, son los factores biológicos que controlan la abundancia bacteriana en diferentes ambientes y por lo tanto tienen un rol clave en la determinación de la composición de las comunidades bacterianas acuáticas (Fuhrman y Noble, 1995). Frente a la infección viral las bacterias también han desarrollado diferentes estrategias que les permiten escapar de ésta (Nold y Zwart, 1998). Algunas estrategias operan en las etapas iniciales de la infección inhibiendo por ejemplo, la unión del virus a la bacteria hospedera o modificando y restringiendo el ingreso del ADN extraño al hospedero (Klanhammer y Fitzgerald, 1994 en Nold y Zwart, 1998).



**Figura 1.** Esquema de la trama trófica acuática, con énfasis en el bucle microbiano. En verde se muestran los principales componentes del bucle y en negro los de la trama trófica clásica. MOD: materia orgánica disuelta, MOP: materia orgánica particulada. Figurada modificada de Pomeroy et al., 2007.

### Composición y diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas acuáticos

El desarrollo de métodos moleculares basados en el análisis comparativo de las secuencias del ARNr 16S como marcador filogenético ha permitido explorar la composición y la diversidad de las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas (Glöckner et al., 1999).

Los principales grupos filogenéticos bacterianos presentes en los ambientes acuáticos son Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria (Nold y Zwart, 1998). Las Proteobacteria se encuentran extensamente distribuidas en estos ambientes, habitando tanto sistemas marinos como continentales (Stackebrandt et al., 1988; Nold y Zwart, 1998). Son muy versátiles desde el punto de vista fisiológico y se las ha podido subclasificar en las clases Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Deltaproteobacteria ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ -Proteobacteria)

de acuerdo a diferencias en sus secuencias del ARNr 16S. Las Alphaproteobacteria son la clase más abundante de las comunidades microbianas acuáticas, están presentes tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas, dominando en los primeros. También han sido detectadas en aguas residuales de plantas de tratamiento y en el suelo (Nold y Zwart, 1998). Al igual que las Alphaproteobacteria, las Gammaproteobacteria tienen una amplia distribución en los sistemas acuáticos pero son más abundantes en los ambientes marinos (Nold y Zwart, 1998). Las Betaproteobacteria son características de ambientes de agua dulce y en aquellos sistemas oligotróficos como los marinos son poco abundantes (Nold y Zwart, 1998; Glöckner et al., 1999). Por otra parte, las Deltaproteobacteria son propias de las comunidades microbianas bentónicas marinas (Nold y Zwart, 1998).

El filo Bacteroidetes presenta amplia distribución en el ambiente. Bacterias pertenecientes a este filo han sido encontradas en el suelo, en los sedimentos, en el agua e incluso en el tracto digestivo de animales. Está compuesto principalmente por las clases: *Bacteroidetes*, *Flavobacteria* y *Sphingobacteria*. Dentro de la clase *Bacteroidetes*, el género más estudiado es *Bacteroides* ya que forma parte de la microbiota<sup>1</sup> intestinal de animales homeotérmicos. En el agua, miembros del filo Bacteroidetes suelen encontrarse asociados a partículas formando parte del bacterioplancton adherido a sustratos (DeLong et al., 1993; Nold y Zwart, 1998), por ejemplo se han detectado en flóculos de plantas de tratamiento (Manz et al., 1994). Varios estudios han demostrado que las bacterias adheridas a partículas tienen grandes volúmenes celulares y altas tasas de crecimiento en comparación con sus contrapartes de vida libre (Pedros-Alio y Brock, 1983; Unanue et al., 1992). Muchas tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos de alto peso molecular a través de la excreción de exoenzimas (DeLong et al., 1993).

Las Actinobacteria son bacterias Gram positivas con un alto contenido de residuos guanina y citosina (High G+C) en su ADN. Son microorganismos muy ubicuos y en los ambientes acuáticos su distribución depende de la geografía y estado trófico de los mismos. Son características de ambientes tanto bentónicos como pelágicos de agua dulce y marina (Nold y Zwart, 1998).

Otros filos importantes de las comunidades microbianas acuáticas están constituidos por cianobacterias y microorganismos del dominio Archaea. Las cianobacterias comprenden un grupo morfológicamente heterogéneo de bacterias fototróficas. Se conocen tanto formas unicelulares como filamentosas. Algunas tienen estructuras citoplasmáticas especializadas en la realización de determinadas funciones, como ser la fijación de nitrógeno (heterocistos) y la resistencia a condiciones de estrés tales como períodos de sequedad, oscuridad y/o congelación (acinetos) (Madigan et al., 2004; Bonilla et al., 2009). Llevan a cabo fotosíntesis oxigénica por lo que generalmente suelen encontrarse en la zona fótica de los cuerpos de agua, donde la incidencia de la luz es más importante que en las capas más profundas.

Los microorganismos del dominio Archaea se encuentran mayoritariamente en ambientes donde las condiciones fisicoquímicas son extremas (como ser temperaturas muy

---

<sup>1</sup> La microbiota incluye al conjunto de microorganismos que vive de forma habitual en el cuerpo humano sano, donde generalmente es beneficiosa para el hombre no solo porque aporta metabolitos esenciales para este, sino porque también compite con los microorganismos patógenos evitando que colonicen los tejidos sanos (Neish, 2009).

altas, concentraciones salinas elevadas o valores de pH extremadamente bajos); aún así han sido detectados en hábitats de agua dulce y salina donde las condiciones ambientales no son tan hostiles (Nold y Zwart, 1998). Aparentemente, las Archaea suelen constituir una proporción relativamente pequeña de las comunidades microbianas acuáticas (DeLong et al., 1994).

Si bien la biomasa bacteriana total suele mantenerse constante a lo largo de la columna de agua, la composición de la comunidad microbiana puede variar en respuesta a factores ambientales y/o biológicos (Nold y Zwart, 1998). Muchos de estos factores imponen una presión selectiva sobre determinados microorganismos. Por ejemplo, la salinidad del agua influye significativamente en los ambientes pelágicos y bentónicos (Nold y Zwart, 1998; Langenheder et al., 2003).

En ocasiones, a lo largo de la columna de agua se forman capas o estratos de igual densidad debido a diferencias en la salinidad y/o en la temperatura entre unas y otras. Como estos estratos no se mezclan fácilmente, se forman gradientes de intensidad de luz, de potenciales de oxidación-reducción, de presiones parciales de hidrógeno y oxígeno y de concentraciones de carbono, nitrógeno y otros nutrientes. Esto provee un amplio rango de condiciones ambientales, lo que se refleja en la gran diversidad de las comunidades microbianas acuáticas que pueden encontrarse (Nold y Zwart, 1998). Otras variables como la disponibilidad de recursos y el grado o el nivel de estrés que presenta un hábitat también influyen en la composición de las comunidades microbianas acuáticas (Nold y Zwart, 1998).

### **Relevancia del agua como recurso natural y problemáticas asociadas a su contaminación**

El agua es un recurso indispensable para la subsistencia de la vida animal y vegetal del planeta. Constituye aproximadamente el 70% de la corteza terrestre, siendo el 97% agua salada (océanos y mares) y el 3% agua dulce (FAO, 2002). De este pequeño porcentaje de agua dulce, una fracción aún menor (aprox. 0,003%) es accesible para el ser humano (ríos, arroyos, lagos) dado a que el resto se encuentra en forma de hielo en los glaciares. El ciclo del agua permite que la misma se renueve constantemente de forma natural (FAO, 2005), sin embargo su uso excesivo puede provocar que el ciclo se interrumpa volviendo al agua un recurso limitado.

El ser humano utiliza el agua para llevar a cabo múltiples actividades siendo las más importantes la producción de alimentos, de energía, la agricultura, la navegación, la pesca, el turismo y la recreación, el vertido de efluentes y fundamentalmente el consumo y uso del agua potable. En Uruguay, el Reglamento Bromatológico Nacional define al agua potable como aquella “apta para la alimentación y uso doméstico o de industrias alimentarias, comprendiendo al agua corriente y de pozo, manantial o aljibe” que cumpla con una serie de características tanto sensoriales, fisicoquímicas como microbiológicas (Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto 315/994).

El aumento de la población y de las actividades humanas en los últimos cincuenta años ha provocado un incremento del consumo de agua con diversos fines y consecuentemente, los niveles de contaminación de la misma han aumentado (EPA, 1993). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define la contaminación del agua

como: “la introducción en el ambiente acuático de sustancias productoras de efectos deletéreos que pueden causar daños a los recursos vivientes, riesgos para la salud humana, obstáculos para las actividades acuáticas (incluida la pesca), el deterioro de la calidad de la misma para consumo y la reducción de los medios de recreo” (FAO, 1997). Existen diversas fuentes por las cuales se produce la contaminación de los sistemas acuáticos. El vertido de efluentes domésticos e industriales a los mismos constituye una forma de contaminación orgánica del agua e incluye a los residuos de los fertilizantes agrícolas, de los plaguicidas e insecticidas que surgen de la actividad ganadera, de los detergentes y de las excreciones del metabolismo animal (FAO, 1997). Estas últimas contribuyen al ingreso de nitrógeno y fósforo alóctono a los ecosistemas acuáticos.

Los índices usualmente empleados por los organismos de gestión para determinar la contaminación orgánica del agua son la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la concentración de oxígeno disuelto (OD). Ambos hacen referencia a la cantidad de materia orgánica presente en el sistema, ya que habrá mayor consumo de oxígeno cuanto mayor sea la concentración de esta y microorganismos respirando (Madigan et al., 2004). Una consecuencia del ingreso sostenido y excesivo de materia orgánica y nutrientes a los sistemas acuáticos es la eutrofización de los mismos. El término “eutrofización” hace referencia a la adición natural o artificial de nutrientes (principalmente N y P) a los cuerpos de agua y a los efectos que esto implica (Natinonal Academy of Sciences, 1969). El principal efecto ocasionado por el ingreso de nutrientes a los sistemas acuáticos es el aumento de su productividad, sin embargo cuando los efectos ocasionados son indeseados, la eutrofización se considera una forma de contaminación del agua (Natinonal Academy of Sciences, 1969). Otras consecuencias negativas de la eutrofización de los sistemas acuáticos incluyen la aparición de *blooms* de algas y cianobacterias (algunas tóxicas), la simplificación de la trama trófica acuática (Conde, 2009) y la reducción de la abundancia y composición de las comunidades planctónicas, bentónicas y de peces (Natinonal Academy of Sciences, 1969).

La presencia de microorganismos en el agua como bacterias, virus y protozoarios, en valores que exceden las concentraciones admitidas por los organismos reguladores, puede afectar su calidad. Para que el agua pueda ser utilizada por el hombre para su consumo (agua potable) debe estar ausente de microorganismos patógenos, el número de coliformes totales y fecales debe ser igual a cero unidades formadoras de colonias (ufc) en cien mililitros de muestra (filtración en membrana), menor a dos bacterias en cien mililitros (número más probable) y el número de bacterias heterótrofas debe ser menor o igual a quinientas ufc por ml ( $\leq 500$  ufc/ml) (Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto 315/994). Cuando el agua contiene concentraciones de estos microorganismos superiores a los anteriormente citados se dice que se ha producido su contaminación microbiológica.

La contaminación del agua puede afectar de manera negativa el uso del agua potable y de recreación (EPA, 1993), representando un riesgo para la salud de muchas personas en varios países, principalmente en aquellos en vías de desarrollo. La presencia de microorganismos patógenos en el agua (que utilizan este medio como vehículo de dispersión) puede ocasionar enfermedades como el cólera, fiebre tifoidea, hepatitis, diarreas, entre otras (WHO, 1993). La pérdida de la diversidad biológica (debido a la mortandad de especies que no

son tolerantes a los contaminantes y a la persistencia de otras que logran resistir a los mismos) se considera otro efecto negativo de la contaminación del agua (Fleeger et al., 2003).

### **Coliformes totales y fecales: microorganismos indicadores de contaminación microbiológica del agua**

En lo que respecta al consumo de agua por el hombre es necesario que este cuente con un sistema de abastecimiento satisfactorio. Una evaluación rápida y sencilla de la calidad del agua para consumo implica el análisis de las características organolépticas de esta, es decir, de aquellas que pueden ser detectadas por los sentidos del consumidor tales como la turbidez, el color, el olor y el sabor. Sin embargo, se reconoce que la ausencia de efectos sensoriales no necesariamente garantiza la inocuidad del agua para consumo humano y por lo tanto se recomienda exhaustivamente la evaluación de su calidad microbiológica. En este sentido, es necesario el análisis de la presencia de patógenos entéricos en el agua que llegan a la misma a través de las descargas de materia fecal proveniente de fuentes puntuales (aguas servidas, efluentes de plantas de tratamiento y de industrias) y/o difusas (agricultura, forestación, escorrentía urbana y silvestre) (Hurst et al., 2002). Las heces de los animales pueden contener una variedad de microorganismos patógenos tales como las especies bacterianas *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, protozoarios y virus (Hurst et al., 2002).

Si se logra identificar el origen de la contaminación fecal y de los microorganismos patógenos implicados, las medidas de remediación y manejo de los cuerpos de agua afectados se pueden llevar adelante de forma más eficiente. Sin embargo, dado que los microorganismos patógenos aparecen en bajas concentraciones en los sistemas acuáticos naturales (Savichteva y Okabe, 2006), la detección y cuantificación de los mismos resulta laboriosa. Además insume mucho tiempo, requiere de costos elevados y no es fácil de llevar a cabo en la mayoría de los casos (CYTED, 2003; Savichteva y Okabe, 2006). Por estos motivos, se ha recurrido a la utilización de microorganismos indicadores. Estos se comportan de manera similar a los patógenos pero se diferencian de ellos en que pueden ser identificados empleando métodos más sencillos, rápidos y económicos (CYTED, 2003). Algunas de las características que debe contar un microorganismo para ser considerado indicador son: no debe ser patógeno y debe ser fácilmente cuantificable, debe estar presente o ausente cuando el patógeno también lo está, debe tener características de persistencia y crecimiento similares a las del patógeno y preferentemente, debe ser resistente al medio ambiente y a agentes desinfectantes en la misma tasa que el microorganismo patógeno (Stetler, 1984). Dentro de los microorganismos indicadores, los de origen fecal son aquellos que constituyen la flora normal intestinal de individuos sanos, están presentes (de forma exclusiva) en las heces de animales homeotérmicos, se presentan en número elevado (de manera de facilitar su identificación y aislamiento), son incapaces de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos y tienen un tiempo de supervivencia igual o superior al de las bacterias patógenas (CYTED, 2003).

Tradicionalmente, los microorganismos ampliamente empleados como indicadores de contaminación fecal del agua son las bacterias coliformes totales y los coliformes y

enterococos fecales (Savichteva y Okabe, 2006). Los **coliformes** son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, aeróbicas o anaeróbicas facultativas que fermentan lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 35 °C durante 48h (WHO, 1993, APHA et al., 1998; Madigan et al., 2004). Los géneros que componen este grupo de bacterias son *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Klebsiella* (Schraft y Watterworth, 2005); pertenecen a la familia *Enterobacteraceae* (bacterias entéricas). Suelen habitar el intestino de animales homeotérmicos (incluyendo al hombre) constituyendo la microbiota o flora normal de estos (Neish, 2009). Los coliformes se introducen en gran número en el ambiente mediante las heces de animales y humanos, por lo que suele considerarse que la mayoría son de origen fecal. Sin embargo, existen muchos coliformes de vida libre (habitando el suelo y el agua) que se transmiten al hombre por contacto con agua y/o alimentos contaminados (Madigan et al., 2004).

Dentro del grupo de los coliformes, los denominados **coliformes fecales** han sido sugeridos como buenos indicadores de contaminación fecal en el agua debido a que se encuentran presentes casi exclusivamente en las heces de los animales homeotérmicos (CYTED, 2003). Los coliformes fecales se distinguen de los totales en su capacidad de fermentar lactosa a 44,5 °C (microorganismos termo-tolerantes) (Madigan et al., 2004). En la actualidad, *Escherichia coli* ha sido reconocida como un buen indicador de contaminación fecal del agua y se recomienda su determinación para el monitoreo de la calidad de la misma (WHO, 1993; APHA et al., 1998; Schraft y Watterworth, 2005).

### **Técnicas microbiológicas tradicionales empleadas para la determinación de coliformes**

Usualmente, la detección de microorganismos patógenos e indicadores en el agua se realiza empleando medios de cultivo selectivos y métodos bioquímicos estándares (Savichteva y Okabe, 2006). En particular, para la determinación de coliformes se emplean las técnicas de fermentación en tubos múltiples (método del Número Más Probable) y filtración en membrana. La primera consiste en inocular una serie de tubos (conteniendo medio de cultivo líquido selectivo) diluciones seriadas de la muestra de agua a analizar. Consta de fases: la presuntiva y la confirmativa. La producción de ácido y gas (como consecuencia de la fermentación de la lactosa) después de incubar los tubos durante 48h a 35 °C indican una reacción presuntiva positiva. Los medios generalmente empleados en esta etapa son lactosa o lauril triptosa. Todos los tubos positivos de esta etapa son sometidos a la fase confirmativa, que implica la incubación durante 48h a 35 °C, generalmente en caldo lactosa verde bilis brillante. La producción de gas confirma la presencia de coliformes totales en la muestra de agua analizada (APHA et al., 1998). Para la determinación de coliformes fecales por esta técnica, los tubos positivos de la etapa confirmativa se incuban durante 24h a 44,5 °C generalmente en medio EC. Una vez más, la producción de gas indica un resultado positivo. La expresión de los resultados se realiza empleando tablas y se expresan como el NMP de coliformes totales/fecales en 100 mL de muestra (APHA et al., 1998).

La otra técnica empleada para la determinación de coliformes consiste en filtrar volúmenes específicos de muestra a través de un filtro estéril donde las bacterias quedan retenidas. Luego, este se coloca sobre una placa de Petri conteniendo un medio sólido

selectivo (agar) y se incuba a 35 °C durante 48h para determinar coliformes totales y a 44,5 °C durante 24h para coliformes fecales. Los medios generalmente empleados son el Endo para coliformes totales (colonias rojas con halo metálico) y el m-FC para coliformes fecales (colonias azules) (APHA et al., 1998). La expresión de los resultados indica presencia o ausencia de ufc en 100 mL de muestra filtrada.

A pesar de que las técnicas microbiológicas tradicionales han sido ampliamente empleadas para la determinación de coliformes, presentan varias limitaciones. En primer lugar, las técnicas dependientes de cultivo pueden subestimar la densidad bacteriana presente en las muestras de agua debido principalmente a que las bacterias en los ambientes acuáticos naturales pueden encontrarse dañadas o estresadas (Savichteva y Okabe, 2006) y por lo tanto puede ser difícil lograr su recuperación en los medios de cultivo. Además, algunos microorganismos son viables en el ambiente en el que se encuentran pero difíciles de cultivar o directamente no han podido ser cultivados en el laboratorio (Amann et al., 1995). Esto se debe principalmente a que son microorganismos adaptados a vivir bajo condiciones ambientales variables y por tanto, sus requerimientos nutricionales también lo son. Como aún no se ha logrado reproducir en el laboratorio el medio de cultivo óptimo para producir su crecimiento, se los conoce como microorganismos no cultivables. Típicamente el agua contiene una abundancia de bacterias heterótrofas varios órdenes de magnitud mayor que el detectado por los cultivos. Este fenómeno es conocido como “la gran anomalía del recuento en placa” (Amann et al., 1995) y se conoce desde que es posible realizar conteos directos al microscopio de epifluorescencia. Por otra parte, los microorganismos que sí se han logrado cultivar lo hacen en medios de cultivos específicos para un tipo o grupo particular de microorganismo (cultivos mono-específicos) y además, generalmente estas técnicas insumen mucho tiempo dado a que algunas bacterias requieren desde varias horas e incluso días para crecer y formar colonias visibles en medios sólidos (Savichteva y Okabe, 2006; Breeuwer y Abee, 2000). Estas limitaciones han llevado a que en las últimas décadas se desarrollen herramientas metodológicas alternativas más rápidas y específicas independientes de cultivo para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua, como las que se describirán a continuación.

### **Técnicas moleculares para la determinación de coliformes**

Las técnicas moleculares frecuentemente empleadas para la determinación de coliformes y otros microorganismos patógenos presentes en el agua son las inmunológicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ* (Savichteva y Okabe, 2006). Las primeras implican el empleo de anticuerpos específicos dirigidos al microorganismo de interés (a través del reconocimiento de componentes presentes en este último) marcados con fluoróforos para lograr su identificación (Savichteva y Okabe, 2006). La PCR permite evaluar la presencia o la ausencia de determinado microorganismo en la muestra analizada a partir de la amplificación de su ADN. En particular, la determinación de coliformes por PCR suele realizarse mediante la amplificación del gen *lacZ* que codifica para la enzima beta-galactosidasa. Otras técnicas que son más rápidas y sensibles que la PCR convencional son la PCR multiplex (que permite la identificación simultánea de varios microorganismos en un solo tubo de reacción) y

la PCR en tiempo real (que permite además de la detección del microorganismo de interés, su cuantificación) (Savichteva y Okabe, 2006). Ambas pueden ser de útil aplicación en los análisis de calidad del agua.

A pesar de que estas técnicas han sido ampliamente empleadas para la detección de microorganismos patógenos e indicadores suelen tener baja especificidad (Savichteva y Okabe, 2006). Por otra parte, las técnicas que implican la detección de los genes de la subunidad menor del ARNr de microorganismos patógenos son más prácticas que las descritas anteriormente. Permiten la detección de los mismos y simultáneamente estiman su viabilidad celular (el número de copias de estos genes se relaciona con su actividad metabólica) (Savichteva y Okabe, 2006). Dentro de estas se pueden citar a los *microarrays* de ADN y a la hibridación *in situ* (Savichteva y Okabe, 2006). Las primeras le permiten al operador realizar hibridaciones simultáneas (alta capacidad de *screening*) lo que resulta en un alto nivel de sensibilidad y detección de los microorganismos de interés. Los *microarrays* de ADN han sido ampliamente empleados para la determinación de factores de virulencia microbianos y la cuantificación de ADN bacteriano en diversas muestras ambientales (Cho y Tiedji., 2002).

Las técnicas de hibridación *in situ* no solo permiten la identificación de bacterias con alta especificidad (la cual depende del diseño de las sondas) sino también su cuantificación. La hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) permite la determinación de la dinámica y la estructura de comunidades microbianas en una amplia diversidad de muestras ambientales (Pernthaler et al., 2002). Consiste en teñir específicamente a los microorganismos de interés empleando sondas de oligonucleótidos marcadas con una o varias moléculas fluorescentes. La molécula blanco de las mismas es la subunidad menor del ARN ribosomal bacteriano (ARNr 16S) (Amann et al., 1990). Esta molécula tiene aproximadamente 1500 nucleótidos de longitud y regiones conservadas denominadas signatura o firma que han permitido identificar y agrupar a las bacterias dentro de determinados grupos filogenéticos (Woese et al., 1990). De esta manera, es posible identificar y cuantificar a las bacterias mediante microscopía de epifluorescencia (Pernthaler et al., 2003) ya que las mismas emiten una señal fluorescente característica según el fluoróforo empleado en la hibridación. El marcaje de las sondas puede ser de dos tipos: directo (por la incorporación de nucleótidos fluorescentes o por el agregado de fluorocromos en uno o varios extremos) o indirecto (por la incorporación de moléculas reporteras que luego son detectadas por anticuerpos fluorescentes u otras moléculas afines).

Generalmente, la hibridación *in situ* se realiza junto a las tinciones con 4´6´-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Porter y Feig, 1980) o naranja de acridina (AO) (Francisco et al., 1973), de manera de enumerar a la totalidad de las bacterias presentes en la muestra. Estos colorantes se unen a los ácidos nucleicos de las mismas y permiten su identificación por la emisión de una señal fluorescente al microscopio de epifluorescencia (el DAPI tiñe el ADN de azul, el AO tiñe de verde el ADN doble hebra y de naranja al ARN o al ADN simple hebra).

A pesar de que la técnica FISH es metodológicamente robusta, presenta algunas limitaciones. La principal desventaja cuando se aplica a muestras de agua de sistemas naturales es la baja intensidad de la señal, generalmente porque las bacterias en estos ambientes son de pequeño tamaño, con tasas de crecimiento lentas y con un contenido ribosómico bajo (Eickhorst y Tippkötter, 2008; Stoecker et al., 2010). Por otra parte, cuando el

contenido ribosómico no es el factor limitante, la baja intensidad de la señal puede atribuirse al propio *quenching* (apagamiento) del fluoróforo o a la ineficiencia de la hibridación (Safak et al., 2006). Por estos motivos y con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la detección es que se han desarrollado diversas estrategias. Una de estas es el empleo de la deposición catalizada de reporteros (*catalyzed reporter deposition, CARD*) luego de la hibridación *in situ* con una sonda conjugada a peroxidasa (Perntaler et al., 2002). La peroxidasa reacciona con sus sustratos el peróxido de hidrógeno y la tiramida (reportero marcado con un fluoróforo) produciendo especies radicalarias. De esta manera, la tiramida activada reacciona con grupos ricos en electrones en el sitio de unión de la peroxidasa y se produce la deposición de moléculas de tiramida en el sitio donde se produjo la hibridación.

Otra estrategia para aumentar la sensibilidad de la hibridación *in situ* es el empleo de sondas marcadas tanto en el extremo 5' como en el 3'. Esto se conoce como sondas de oligonucleótidos doblemente marcadas (*Double-Oligonucleotide-Probe-FISH, DOPE-FISH*) y permite aumentar la intensidad de la señal sin provocar fluorescencia inespecífica de microorganismos no deseados (Stoecker et al., 2010).

### **La viabilidad celular y su importancia en el monitoreo de la calidad microbiológica del agua**

El desarrollo de métodos rápidos, sensibles y específicos para la detección e identificación de bacterias ambientales con la determinación simultánea de su viabilidad celular, es una estrategia clave para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua dado que permite conocer el nivel de riesgo para la salud pública que implica la presencia de microorganismos patógenos o indicadores de contaminación en el agua para consumo (Berney et al., 2008). Además, conocer la viabilidad de los microorganismos es crucial en otras aplicaciones como ser la detección y enumeración de microorganismos en alimentos, la evaluación de los procesos de desinfección, la evaluación de la calidad en la producción de antibióticos, entre otros (Breeuwer y Abee, 2000).

Usualmente, las bacterias viables son definidas como aquellas células que tienen la habilidad de crecer activamente y formar colonias visibles en medios sólidos (Savichteva y Okabe, 2006). Como se mencionó anteriormente las técnicas de cultivo en placa presentan limitaciones (Amann et al., 1995; Savichteva y Okabe, 2006; Berney et al., 2008), debido a esto es que se han desarrollado métodos de viabilidad bacteriana alternativos a los cultivos basados en su mayoría en la demostración de la integridad o la actividad celular. Dichos métodos no son empleados en análisis de rutina de calidad de agua, sino más bien con fines de investigación, ya que permiten el análisis de un alto número de muestras en tiempos cortos. Éstos incluyen el análisis por citometría de flujo (Porter et al., 1996), técnicas de tinción fluorescente (Diaper y Edwards, 1994; Caron et al., 1998; Turner et al., 2000) y la evaluación de respuestas fisiológicas y actividades metabólicas (Williams et al., 1998).

La determinación de la actividad e integridad celular se realiza principalmente a través de tinciones vitales que permiten distinguir entre células metabólicamente activas de células inactivas y entre células que mantienen la integridad de sus componentes celulares,

principalmente su membrana plasmática, de las que no. Estas tinciones relacionan determinadas características celulares con propiedades fisiológicas (Williams et al., 1998).

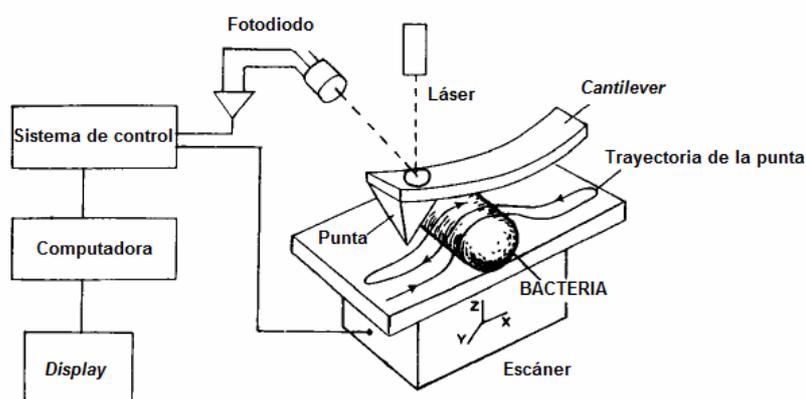
Por lo general, las células metabólicamente activas suelen determinarse a partir de la medición de la respiración celular (Jørgensen et al., 1994 en Breeuwer y Abee, 2000) o su contenido ribosómico (Williams et al., 1998). Como los ribosomas son los responsables de la síntesis de proteínas, un contenido alto de los mismos se relaciona con células con una tasa elevada de síntesis proteica y por tanto, con células metabólicamente activas. En este sentido, las técnicas de hibridación *in situ* que emplean sondas dirigidas a la subunidad menor del ARNr bacteriano se consideran un buen indicador para tal efecto. Por otra parte, la pérdida de la integridad de la membrana celular se asocia con células no viables, tanto en eucariotas como en procariotas, dado la relevancia de la misma en las funciones celulares (mantenimiento del equilibrio interno, permeabilidad selectiva a determinados solutos, entre otras). Ejemplos de algunos colorantes empleados para determinar integridad celular son el yoduro de propidio (IP) (López-Amorós et al., 1995), bromuro de etidio (BrEt), blanco de calcofluor, SYTOs (Lebaron et al., 1998) y Live/Dead® Bac-light™ (López-Amorós et al., 1995; Mason et al., 1995). El principio general de estos colorantes es que al ser impermeables a la membrana plasmática, las células viables que tienen su membrana intacta no se encuentran teñidas; mientras que aquellas células cuyas membranas sí se encuentran dañadas o comprometidas permiten el ingreso del colorante y por tanto, aparecen teñidas con el mismo (Breeuwer y Abee, 2000).

El mantenimiento de un ambiente interno reductor es una característica ampliamente empleada para indicar células viables (Williams et al., 1998). Los colorantes usualmente empleados para ello son el 2-(p-iodophenyl)-3(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) y el 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) (Epstein y Rossel, 1995). Otros compuestos como el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) también sirven como indicadores de viabilidad celular e indican tanto actividad como integridad de la célula. El CFDA actúa como sustrato para esterasas intracelulares y su clivaje enzimático produce un sustrato coloreado, reflejando actividad de la célula. A su vez, la retención del producto en el interior celular demuestra integridad de la membrana plasmática (Porter et al., 1995).

Con los métodos anteriormente descritos, el estado fisiológico de una célula (viva o muerta) generalmente queda definido por las propiedades del colorante empleado. En ocasiones, la interpretación de los resultados basados en estas tinciones puede resultar ambigua, principalmente porque algunas de ellas presentan limitaciones (Williams et al., 1998; Shi et al., 2007). Por ejemplo, el yoduro de propidio es el colorante mayoritariamente empleado en los ensayos de viabilidad celular porque es rápido y práctico de aplicar (Hoefel et al., 2003; Phe et al., 2005). Sin embargo, estudios donde se analizó la integridad de las membranas plasmáticas de bacterias del suelo en fase exponencial de crecimiento reportaron que las mismas estaban teñidas con el colorante (Shi et al., 2007). Otros autores indicaron que el empleo de IP como indicador de viabilidad celular es sensible a la temperatura y al pH al cual se realiza la tinción, a la concentración del colorante empleado y al tiempo de incubación (Williams et al., 1998). Por lo tanto, las condiciones a las que se trabaja con yoduro de propidio generalmente inciden en los resultados obtenidos y circunstancialmente, pueden conducir a falsos positivos.

## Microscopía de Fuerza Atómica: una alternativa para analizar la fisiología bacteriana

El microscopio de fuerza atómica (MFA) se describió por primera vez en 1986 y desde entonces ha permitido la dilucidación de la microestructura de materiales (Allison et al., 2010). Su funcionamiento se basa en la interacción entre la punta del microscopio y la superficie de la muestra, lo que permite producir imágenes de superficies en tres dimensiones, con alta resolución espacial (escala nanométrica) y en tiempo real (Cruz y Castrellón-Uribe, 2005). Asimismo, permite obtener información de otras propiedades físicas de los materiales analizados como viscoelasticidad, fuerza eléctrica y magnética, entre otras. Los elementos que constituyen un microscopio de este tipo son: punta, *cantilever*, escáner, detector, sistema de control electrónico y el sistema que aísla la vibración (Figura 2). Estos dos últimos son similares para la mayoría de los MFAs. La punta se selecciona de acuerdo al tipo de muestra a analizar y puede ser de distintos materiales, los más comunes son nitruro de silicio o silicio (Cruz y Castrellón-Uribe, 2005).



**Figura 2.** Diagrama esquemático de un microscopio de fuerza atómica.  
Figura modificada de Braga y Ricci, 1998.

El empleo de este microscopio es ventajoso en comparación con otros convencionales. Por ejemplo, brinda imágenes de estructuras biológicas que requieren mínima preparación de la muestra en el laboratorio y permite generar imágenes de células vivas (Allison et al., 2010). Los primeros trabajos descritos con microscopía de fuerza atómica fueron con células eucariotas ya que por su gran tamaño, se adhieren fácilmente a las superficies del soporte. Sin embargo, las células procariotas y las levaduras, al ser de menor tamaño, requieren una adecuada inmovilización sobre las superficies previo a producirse su análisis (Allison et al., 2010). Por lo tanto, la etapa de inmovilización de biomoléculas y células sobre la superficie en la cual se va a producir el escaneo es crítica para la obtención de imágenes con este microscopio. En este sentido, una técnica efectiva de inmovilización será aquella que posicione a las células sobre el soporte de manera tal que las fuerzas que les ejerce la punta del microscopio sean estables y minimicen las posibilidades de pérdida de muestra (Doktycz et al.,

2003). Los agentes inmovilizantes más frecuentemente empleados en MFA son poli-L-lisina, gelatina y silano. Estudios anteriores han reportado imágenes de buena calidad obtenidas con este microscopio para bacterias Gram negativas (*E. coli*) y Gram positivas (*S. aureus*), donde se utilizaron estos agentes para inmovilizar (Doktycz et al., 2003).

Dado a que este microscopio permite obtener información de la superficie de las muestras biológicas, constituye una herramienta útil para analizar la presencia de elementos de daño sobre las membranas plasmáticas y/o paredes celulares, de manera de analizar la viabilidad celular por técnicas alternativas a las tinciones vitales. De esta manera, se puede conocer el estado fisiológico de las células a través del estado de sus membranas o paredes.

## ANTECEDENTES

### Sitio de estudio

El Cabo Polonio es un balneario ubicado en la costa atlántica uruguayaya (Figura 3). Constituye una de las pocas zonas que aún conserva características representativas de paisaje natural en el país. La multiplicidad de elementos naturales y su singular belleza escénica le confieren a este sitio un alto potencial para diferentes modalidades recreativas y turísticas basadas en la naturaleza (SNAP, 2009).



**Figura 3.** Ubicación de Cabo Polonio, departamento de Rocha.

Dados sus destacados valores naturales y culturales asociados, Cabo Polonio ingresó en mayo del 2009 al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) bajo la categoría de Parque Nacional. La misma hace referencia a las áreas cuyos ecosistemas no han sido alterados por la actividad humana y que contienen especies vegetales y animales, sitios geomórficos y hábitats declarados de interés científico, educacional y recreativo (SNAP, 2009). La zona propuesta como protegida se encuentra en la costa atlántica del departamento de Rocha situada entre los 54° 17' 45'' y 53° 33' 1'' de longitud Oeste y entre los 34° 35' 48'' y 34° 4' 6'' de latitud Sur.

El Parque Nacional Cabo Polonio posee una heterogeneidad de ambientes naturales que incluyen playas arenosas, puntas rocosas, dunas, bosque nativo costero, pequeños humedales, ambientes oceánicos e islas. Esta área alberga varias especies prioritarias para el SNAP, incluyendo especies en peligro o amenazadas de extinción (como el sapito de Darwin), especies vegetales y de animales con distribución restringida (por ejemplo: la banana do mato,

la rana de cuatro ojos y la tortuga de canaleta) y especies migratorias de importancia regional y global (gaviotines, ballena franca austral, tortuga verde).

También comprende sitios clave para el ciclo anual de crustáceos de interés comercial (camarón rosado, marino, langostino de mar) y para la cría y la alimentación de más de 47 especies de peces (tiburón gatuso, corvina, brótola, pejerrey). En sus islas se localiza casi la mitad de las poblaciones de lobo marino fino y león marino de Uruguay, siendo estas áreas utilizadas para la reproducción y la cría (SNAP, 2009).

En particular, el Parque Nacional Cabo Polonio se destaca por poseer un sistema de dunas móviles (que llegan a superar los 20 metros de altura) que constituye el remanente más extenso de una faja arenosa que antiguamente se extendía a lo largo de la costa uruguaya (SNAP, 2009).

El poblado de Cabo Polonio, donde hoy viven aproximadamente 70 personas, tuvo su origen en el siglo XIX en torno a la explotación de lobos marinos (SNAP, 2009). En la actualidad, en los meses de temporada estival el número de residentes temporales y visitantes incrementa motivados principalmente por la belleza y tranquilidad de la zona (Barreneche, 2012). Como ha sucedido en otros sitios, la actividad humana ha ocasionado impactos y repercusiones en el ambiente de la zona. Como ejemplo, en el Polonio ha aumentado la construcción de viviendas en zonas no habilitadas para ello (cercanas al mar o a las dunas) y junto a las descargas domésticas realizadas por los habitantes y visitantes de la zona (Barreneche, 2012) han contribuido a la contaminación del agua de las cachimbas (Piccini, comunicación personal) y probablemente de las napas freáticas y de las playas. Las cachimbas son pozos de los cuales se puede extraer agua para consumo (Figura 4) que se llenan con agua de las napas freáticas (dulce). La mayoría de las cachimbas se encuentran construidas a pocos metros de distancia de los pozos sépticos de las viviendas (Figura 5). Por tanto, si se considera la naturaleza arenosa del terreno es plausible pensar que el intercambio de agua entre ambos puede estar favorecido, lo que puede provocar la contaminación orgánica y microbiológica del agua de las cachimbas. Por esta razón, determinar el tipo y concentración de microorganismos presentes en el agua de las cachimbas es importante al momento de establecer su nivel de contaminación, así como también al momento de la toma de decisiones con el objetivo de preservar la zona. En este sentido, una aproximación al estudio de la calidad del agua de las cachimbas de Cabo Polonio podría ser útil para obtener información para el diseño de estrategias preventivas o de remediación de la misma, haciendo énfasis en su uso racional y la gestión adecuada del recurso, que puedan ser aprovechadas por el SNAP o por otras autoridades pertinentes.



**Figura 4.** Fotos de cachimbas en Cabo Polonio.



**Figura 5.** Fotos de cachimbas y pozos sépticos localizados a pocos metros de distancia unos de otros, en las construcciones del Cabo Polonio. Las flechas indican la ubicación de los pozos sépticos.

### **Antecedentes específicos del sitio**

Estudios anteriores realizados en el año 2007 en agua de pozos de Cabo Polonio demostraron que la misma excedía los límites aceptables de coliformes totales ( $<2/\text{mL}$ ) y bacterias heterótrofas ( $\leq 500 \text{ ufc/ml}$ ) para ser utilizada para consumo. Todas las cachimbas analizadas contenían coliformes totales, un máximo de casi 2400 coliformes en 100 mL y un mínimo de 4 coliformes en 100 mL (Piccini y Pérez, no publicado). Con respecto a la detección de bacterias heterótrofas totales, el rango encontrado fue de  $343\text{-}9400 \text{ ufc mL}^{-1}$ . También se analizó la presencia de coliformes fecales siendo este resultado positivo en todos los casos. Asimismo, los valores de nitrógeno y fósforo total de las cachimbas analizadas mostraron que aquellas que presentaron el mayor número de ufc de bacterias heterótrofas tenían concentraciones de nitrógeno total más elevadas. Estos resultados indicaron que las cachimbas con mayor concentración de nutrientes (principalmente N total) tenían mayor abundancia de coliformes totales y bacterias heterótrofas.

Por otra parte, en febrero del año 2012 se determinó la concentración de *E. coli* en el agua de 22 cachimbas de Cabo Polonio mediante hibridación fluorescente, empleando una sonda doblemente marcada (DOPE-FISH). Los resultados indicaron que la mayor concentración de bacterias indicadoras de contaminación fecal se encontró en la zona que tiene mayor densidad de viviendas y menor o ausencia de vegetación nativa. A su vez, dicho estudio indicó que el agua de la cachimba empleada para llevar adelante el experimento del presente trabajo contenía  $1,20 \times 10^4 \text{ E. coli mL}^{-1}$  en ese momento (Piccini, datos no publicados). Además, en febrero del año 2013 se llevó adelante el segundo muestreo de las 22 cachimbas muestreadas el año anterior. Si bien aún resta determinar la abundancia de *E. coli* mediante DOPE-FISH, se determinó el número de ufc de coliformes fecales mediante la técnica filtración en membrana y se encontró que la cachimba empleada como modelo de estudio en el presente trabajo contenía 184 ufc de coliformes fecales en 100 mL de agua analizada. Está pendiente determinar la concentración de materia orgánica presente en el agua de la misma (Piccini y Soumastre, datos no publicados).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y los antecedentes particulares del sitio de estudio, en el presente trabajo nos planteamos la siguiente hipótesis y objetivos.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

---

El crecimiento del bacterioplancton en los ecosistemas acuáticos naturales puede estimularse por el ingreso alóctono (externo al sistema) de materia orgánica (MO) y nutrientes (Tranvik, 1992; Cotner et al., 2002; Farjalla et al., 2009). Dicho ingreso puede deberse a las descargas de aguas servidas. En el Cabo Polonio, la presencia de pozos sépticos localizados a escasos metros de distancia de los pozos de agua subsuperficial (cachimbas), puede contribuir al ingreso alóctono de MO y nutrientes a las cachimbas, a través de la infiltración de aguas servidas desde los primeros. Asimismo, las aguas servidas contienen bacterias procedentes de las excreciones del metabolismo animal (principalmente coliformes fecales (Hurst et al., 2002)) y por lo tanto, en caso de ocurrir infiltración, el agua de las cachimbas puede contaminarse con tales bacterias. Por otra parte, la lluvia y la extracción de agua que realizan los usuarios de las cachimbas altera el tiempo de residencia del agua dentro de estos pozos (entendido como el ingreso o no de agua del subsuelo). La hipótesis del presente trabajo propone que dichas alteraciones en el tiempo de residencia afectan la dinámica (abundancia y actividad) de las poblaciones bacterianas allí presentes debido al ingreso de agua conteniendo materia orgánica y nutrientes desde los pozos sépticos cercanos. La variación en dicha dinámica es capaz de detectarse a través de los cambios experimentados por una población indicadora (*E. coli*) mediante FISH en combinación con tinciones vitales.

## OBJETIVOS

---

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del tiempo de residencia del agua sobre la dinámica de una población bacteriana indicadora (*Escherichia coli*), confinando agua de una cachimba de Cabo Polonio dentro de un recipiente y sometiéndola a dos tratamientos donde se modifica el tiempo de residencia.

### Objetivos específicos

1. Conocer la abundancia de las poblaciones naturales de *E. coli* en el agua de la cachimba (*in situ*) así como la abundancia de la población de *E. coli* indicadora durante el experimento (DOPE-FISH).
2. Determinar la concentración de materia orgánica (MO) y sólidos en suspensión (SS) en el agua de la cachimba y en las muestras experimentales (Método Gravimétrico/Ignición).
3. Evaluar la viabilidad de las células bacterianas *in situ* y en las muestras del experimento (IP y microscopía de epifluorescencia) como alternativa al recuento en placa.
4. Conocer la dinámica del ensamblaje bacteriano *in situ* y en las muestras del experimento (CARD-FISH).
5. Evaluar la validez del empleo de yoduro de propidio como indicador de viabilidad celular (MFA y microscopía de epifluorescencia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Estrategia y diseño experimental

Con el fin de contrastar la hipótesis anteriormente mencionada se realizó un experimento en setiembre del año 2011 en Cabo Polonio, combinando aproximaciones moleculares con microscopía. Se empleó una aproximación que permitiera simular el efecto de la extracción de agua realizada por los usuarios y el consiguiente llenado de la cachimba con el agua circundante, para determinar si el agua que ingresa estimula el crecimiento microbiano, más especialmente el de coliformes fecales. Asimismo, se ensayó una aproximación independiente del cultivo para estudiar la dinámica de la abundancia y viabilidad bacteriana. Se empleó como “proxy” un cultivo conocido de *E. coli* que se inoculó como se detalla más adelante. La cachimba en la cual se trabajó se encontraba en la zona de dunas (Latitud: 34° 23' 51.03''S, Longitud: 53°47'1.53''O) destapada. Para realizar el experimento se colectó agua del pozo en dos botellas de vidrio tipo Schott de 1L (microcosmos) a la que se le agregó un inóculo de *E. coli* XL1 BLUE previamente incubada *overnight* en medio Luria Bertani (LB, concentración final  $1 \times 10^4$  bacterias mL<sup>-1</sup>). Con los microcosmos se realizaron dos tratamientos (tres réplicas de cada uno) que se incubaron a 17 °C. Los mismos consistieron en:

- A) Extracción de 100 mL de agua de cada botella a las 0, 2, 4 y 8hs (tratamiento estático).
- B) Extracción de 100 mL de agua de cada botella y sustitución por 100 mL de agua del pozo prefiltrada por 0,45 y 0,22  $\mu\text{m}$  a las 0, 2, 4 y 8 horas (tratamiento remoción) (Figura 6).

Las muestras de agua extraídas de las botellas se emplearon para determinar la abundancia de la población inoculada (DOPE-FISH), la estructura del ensamblaje bacteriano natural (CARD-FISH), ensayo de viabilidad celular (tinción con yoduro de propidio) y determinación de concentración de MOP y SS. De esta manera, se pretendió conocer el efecto del ingreso de nutrientes cambiando el tiempo de residencia del agua. También se tomaron muestras de la cachimba *in situ* para realizar los mismos análisis que en las muestras extraídas del experimento.

Todas las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% (vol/vol), luego se fraccionaron a la mitad de manera de emplear 50 mL para la determinación de MO y 50 mL para el resto de los análisis. Una vez en el laboratorio, las muestras para MO se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mientras que las muestras para FISH, CARD-FISH y el ensayo de viabilidad celular se filtraron (2 mL) a través de filtros blancos de policarbonato (GTTP, 25 mm de diámetro, Millipore) de 0,22  $\mu\text{m}$  tamaño de poro. Los filtros se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.



**Figura 6.** Esquema del diseño experimental. Las flechas rojas indican extracción de 100 mL de agua del microcosmo y las verdes, la incorporación de 100 mL de agua de la cachimba prefiltrada.

## Cuantificación de la abundancia de *E. coli* mediante DOPE-FISH

Para la determinación de la abundancia de *E. coli* se realizó la técnica FISH empleando una sonda específica para esta especie bacteriana, EnterbactB (GAAGCCACGCCTCAAGGGC) diseñada por Ootsubo y colaboradores en el 2002; marcada en ambos extremos con Cy3 (excitación 548 nm/ emisión 562 nm). La misma ( $50 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ ) se aplicó sobre secciones de los filtros junto al buffer de hibridación (NaCl 0,9 M, Tris/HCl 0,02M [pH=7.5], formamida al 35%, duodecil sulfato de sodio (0,01 % [wt/vol]), agua miliQ c.s.p 2 mL) y se incubó durante 90 minutos a 46 °C. La relación sonda: buffer de hibridación fue 1:10 (3  $\mu\text{L}$  de sonda: 30  $\mu\text{L}$  buffer por filtro). Se hibridó en presencia de reactivo bloqueante (Sigma). Luego, los filtros se lavaron 15 minutos a 48 °C en buffer de lavado precalentado (EDTA 5 mM [p=8.0], Tris/HCl 20mM [pH=7.4-7.6], NaCl 70 mM, duodecil sulfato de sodio (0,01 % [wt/vol]) y agua miliQ c.s.p 10 mL) y 15 minutos a temperatura ambiente en PBS 1x. Finalmente, se tiñeron 15 a temperatura ambiente con DAPI ( $1 \mu\text{g}\text{mL}^{-1}$ ), se lavaron en agua miliQ y etanol al 70 % (vol/vol) y se secaron a temperatura ambiente. Se montaron en portaobjetos de vidrio empleando citifluor y se conservaron a -20 °C hasta su posterior observación al microscopio de epifluorescencia.

## Determinación de la concentración de materia orgánica particulada y sólidos en suspensión

La determinación de materia orgánica particulada y sólidos en suspensión de las muestras del experimento se llevó a cabo en colaboración con la Sección de Limnología de la Facultad de Ciencias. Los triplicados de las muestras de cada tiempo y tratamiento se integraron de manera de trabajar con una solución que tuviera una turbidez tal que pudiera ser detectada por este método.

En primer lugar se quemó en mufla durante 30 minutos a 500 °C filtros de fibra de vidrio (GF/F, 0.7  $\mu\text{m}$  diámetro de poro, Whatman) para remover posibles trazas de MO. Luego se pesaron (peso filtros, g). A continuación se filtraron volúmenes conocidos de muestras (volumen filtrado, mL), se secaron en estufa durante 24h y se pesaron nuevamente (peso filtro seco, g). Finalmente, se quemaron en mufla durante 15 minutos a 450-500 °C y se pesaron (peso filtro quemado, g). Se calculó el contenido de materia orgánica particulada y sólidos en suspensión, empleando las fórmulas I y II, respectivamente.

Fórmula I.

$$\text{mg/L de SS} = \frac{((\text{peso filtro, g}) - (\text{peso filtro seco, g})) \times 10^6}{\text{Volumen muestra (mL)}}$$

Fórmula II.

$$\text{mg/L de MOP} = \frac{((\text{peso filtro seco, g}) - (\text{peso filtro quemado, g})) \times 10^6}{\text{Volumen muestra (mL)}}$$

El porcentaje de materia orgánica en suspensión se calculó empleando la fórmula III.

Fórmula III.

$$\% \text{ MOS} = \frac{(\text{mg/L, MOS}) \times 100}{(\text{mg/L, SS})}$$

## Viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular las secciones de los filtros se incubaron en una solución de IP ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y DAPI ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron en agua miliQ y etanol al 70% (vol/vol), se secaron a temperatura ambiente y se montaron en portaobjetos de vidrio. Inmediatamente se identificó y cuantificó a las bacterias no viables por microscopía de epifluorescencia. La abundancia de las bacterias viables se determinó a partir de la diferencia entre las bacterias totales y las no viables.

## Análisis de la abundancia y composición de la comunidad bacteriana mediante CARD-FISH

El análisis de la abundancia y composición de la comunidad bacteriana del sistema de estudio se realizó mediante la técnica CARD-FISH empleando sondas dirigidas a los principales filos bacterianos presentes en los ambientes acuáticos: Proteobacteria (dentro de este las subclases alpha-, beta- y gamma), Actinobacteria y Bacteroidetes (Ver Tabla 1). El protocolo que se utilizó como referencia fue el propuesto por Pernthaler y colaboradores en el año 2002.

Los filtros para CARD-FISH se embebieron en agarosa (0,1 % [wt/vol] en agua miliQ) y se secaron completamente a 37 °C. Luego se deshidrataron en etanol al 70 % (vol/vol) y se secaron a temperatura ambiente. Para permeabilizar las paredes celulares e inactivar a las nucleasas endógenas, los filtros se incubaron una hora a 37 °C en una solución de lisozima<sup>2</sup> ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y 15 minutos a 37 °C en una solución de proteinasa K ( $0,09 \text{ U mL}^{-1}$ ), respectivamente (Teira et al., 2004). A continuación se lavaron tres veces en agua miliQ y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de HCl  $0,01 \text{ M}$ <sup>3</sup>. Posteriormente, los filtros se cortaron en secciones donde se realizaron las hibridaciones correspondientes. Cada sonda ( $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) se aplicó en buffer de hibridación (NaCl 0,9 M, Tris/HCl 0,02M [pH=7.5], formamida -Ver Tabla 1-, duodecil sulfato de sodio (0,2 % [wt/vol]), H<sub>2</sub>O miliQ c.s.p 100 $\mu\text{L}$ ) en una relación 1:100 (1  $\mu\text{L}$  de sonda en 100  $\mu\text{L}$  de buffer) por filtro, durante 2 horas 30 minutos a 35 °C. Las sondas BET42a y GAM42a se hibridaron en presencia de competidores (Manz et al., 1992; Glöckner et al., 1999). Luego, los filtros se lavaron 15 minutos a 37 °C en buffer de lavado precalentado (EDTA 5 mM [p=8.0], Tris/HCl 20mM [pH=7.4-7.6], NaCl-Ver Tabla 1-, duodecil sulfato de sodio (0,5 % [wt/vol]) y H<sub>2</sub>O miliQ c.s.p 10 mL) y 15 minutos a temperatura ambiente en PBS 1x. Inmediatamente las secciones de los filtros se incubaron 15 minutos a 37 °C en una solución compuesta por el buffer de amplificación (dextrán sulfato (10 % [wt/vol]), NaCl 2 M, reactivo bloqueante (0.1 % [wt/vol]) y 0,15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS) y tiramida (1mg/mL) marcada con isotiocianato de fluoresceína, FITC (excitación 494 nm/emisión 518 nm). Luego de la amplificación, los filtros se lavaron en abundante agua miliQ, etanol al 70 % (vol/vol) y se secaron completamente a temperatura ambiente. Finalmente, se tiñeron 5 minutos en DAPI ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), se lavaron en agua miliQ y etanol al 70 % (vol/vol) y se secaron a temperatura

---

<sup>2</sup> La lisozima es una enzima que hidroliza los enlaces  $\beta$ -1,4 de los residuos que componen el peptidoglicano presente en la pared bacteriana ocasionando la ruptura de la misma.

<sup>3</sup> La incubación en HCl inhibe a las peroxidasas endógenas y a los residuos de proteinasa K.

ambiente. Se montaron en portaobjetos de vidrio empleando citifluor y se conservaron a -20 °C hasta su posterior observación al microscopio de epifluorescencia.

Sonda	Especificidad	Secuencia de la sonda(5'-3')	Sitio diana	% FA	Referencia
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S	55	Amann et al., 1990.
ALF968	Alphaproteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S	40	Neef, 1997.
BET42a	Betaproteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S	55	Manz et al., 1992.
GAM42a	Gammaproteobacteria	GCCTTCCACATCGTTT	23S	55	Manz et al., 1992.
CF319a	Bacteroidetes	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S	35	Manz et al., 1996.
HGC69a	Actinobacteria	TATAGTTACCACCGCCGT	23S	35	Roller et al., 1994.

**Tabla 1.** Sondas empleadas para la determinación por CARD-FISH. % FA corresponde al porcentaje de formamida empleado en las hibridaciones.

### Cuantificación de las bacterias por microscopía de epifluorescencia

Para la cuantificación bacteriana se utilizó un microscopio Olympus IX81 contando tantos campos necesarios hasta alcanzar un total de 1000 células por muestra, empleando un objetivo 100x y aceite de inmersión. La abundancia bacteriana total se determinó contando las bacterias teñidas con DAPI que se identificaron por la emisión de una señal fluorescente azul. Las bacterias hibridadas con la sonda específica para *Escherichia coli* se identificaron por la emisión de una señal fluorescente roja (Cy3) y los distintos grupos bacterianos (Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria) por la emisión de una señal fluorescente verde (FITC); luego de excitar a las muestras con UV. De manera similar, la cuantificación de las bacterias no viables se realizó contando las células que emitieron una señal fluorescente roja (IP). En todos los casos, el número de bacterias por mililitro (abundancia bacteriana/ml) se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ bacterias/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Bacterias} \times (\text{WA} [\mu\text{m}^2])}{(\text{N}^\circ \text{ campos}) \times (\text{Volumen [mL]}) \times (\text{N}^\circ \text{ Cuadrados}) \times (\text{Área grilla})}$$

Donde: WA, es el área del filtro ocupada por la muestra; N° campos, es la cantidad de campos contados hasta alcanzar un total de 1000 bacterias, Volumen, es el volumen de muestra filtrado; N° Cuadrados, son la cantidad de cuadraditos de la grilla contados.

## **Evaluación de la validez del empleo de yoduro de propidio como indicador de viabilidad celular**

Con el fin de confirmar que la tinción empleada (IP) para evaluar la integridad de membranas (y por tanto viabilidad celular) efectivamente ingresó en células dañadas, se aplicó IP a células previamente tratadas con lisozima (se emplearon las mismas muestras hibridadas con la sonda para Alphaproteobacteria) y se cuantificó el porcentaje de células teñidas con este colorante del total teñidas con DAPI. Se esperó detectar por microscopía de epifluorescencia que las bacterias tratadas con lisozima estuvieran teñidas con IP (por encontrarse dañadas), o de lo contrario los resultados obtenidos previamente por hibridación fluorescente no serían confiables y a su vez, el yoduro de propidio no estaría indicando bacterias con membranas plasmáticas dañadas.

Además, se confirmó que la integridad de las membranas de las células teñidas con IP estuviera comprometida mediante microscopía de fuerza atómica, lo cual involucró el desarrollo de un protocolo adecuado a nuestro objeto de estudio y el empleo del único microscopio de fuerza atómica empleado para muestras biológicas con que cuenta el país. Implicó además la puesta a punto de la preparación de muestras, la configuración del microscopio y el entrenamiento como usuario para poder obtener imágenes adecuadas e información útil. Se esperaba observar la presencia de poros u otros signos de daño de la membrana celular (reclutamiento de vesículas, formación de cúmulos de péptidos tipo miscelas sobre la membrana, etc) sobre la superficie de bacterias marcadas con IP (Malfatti y Azam, 2009; Li et al., 2006). El protocolo utilizado se basó en el propuesto por Malfatti y Azam en 2009 con diversas modificaciones realizadas de acuerdo a las necesidades de nuestro estudio. Se trabajó sobre mica fresca y una solución de polilisina al 0,1% (vol/vol) como agente inmovilizante. Las muestras de ambos tratamientos se filtraron a través de filtros blancos de nitrato de celulosa (8  $\mu\text{m}$  diámetro de poro, Millipore) y se utilizó 200  $\mu\text{l}$  de muestra filtrada para llevar a cabo el ensayo. Se realizó una tinción con DAPI e IP (ambos, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  15 minutos) a temperatura ambiente, se lavó los filtros varios veces en agua destilada y se los dejó secar a la misma temperatura. Inmediatamente se procedió al escaneo de los preparados en la plataforma de Microscopía de Fuerza Atómica del IIBCE (Bioscope Catalyst).

### **Análisis estadístico**

Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica (distribución normal y homogeneidad de varianzas) se realizó el test de la U de Mann-Whitney para evaluar si ocurrieron diferencias significativas en las abundancias bacterianas entre los distintos tiempos de incubación (en ambos tratamientos). Se consideraron diferencias significativas cuando  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa STATISTICA 7.

## RESULTADOS

### Cuantificación de la abundancia de *E. coli* mediante DOPE-FISH

La abundancia natural de las poblaciones de *E. coli* encontradas *in situ* fue de  $8,59 \times 10^3$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que las bacterias totales fueron  $2,49 \times 10^5$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ .

Cuando se determinó la abundancia de la población de *E. coli* inoculada en el tratamiento estático, se encontró un aumento significativo a las 4 horas de incubación respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ), observándose luego una disminución no significativa hacia el final de la incubación (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) (Figura 7). Asimismo, la abundancia bacteriana total en este tratamiento presentó la misma tendencia que la población de *E. coli* (Figura 7), aumentando significativamente a las 4 horas de incubación (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) y disminuyendo hacia el final del mismo (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ). Se observó además en este tratamiento la presencia de bacterias filamentosas que no fueron cuantificadas (Figura 8).

En el tratamiento remoción la abundancia de *E. coli* aumentó significativamente durante toda la incubación respecto al tiempo inicial (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ), al igual que lo sucedido con la abundancia bacteriana total (Figuras 7 y 9).

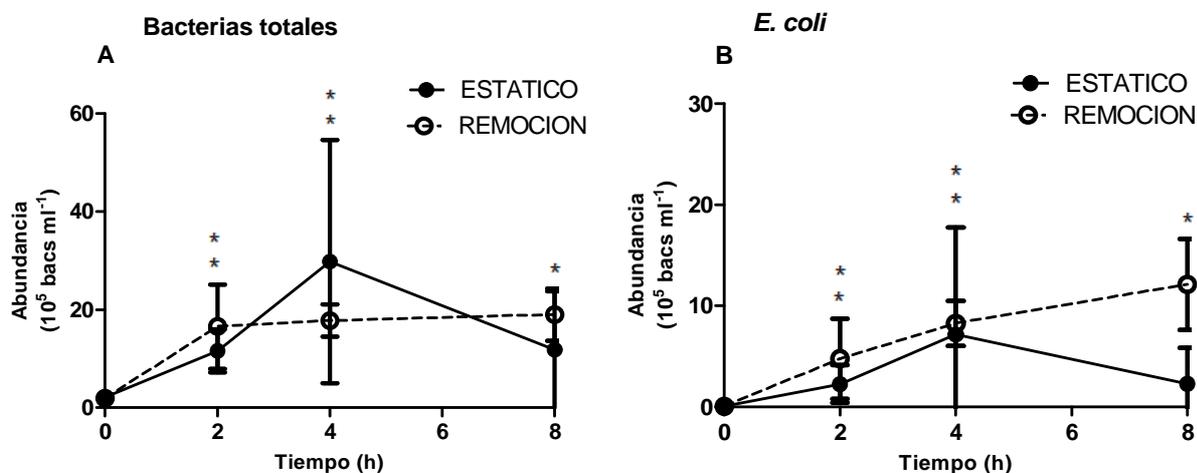
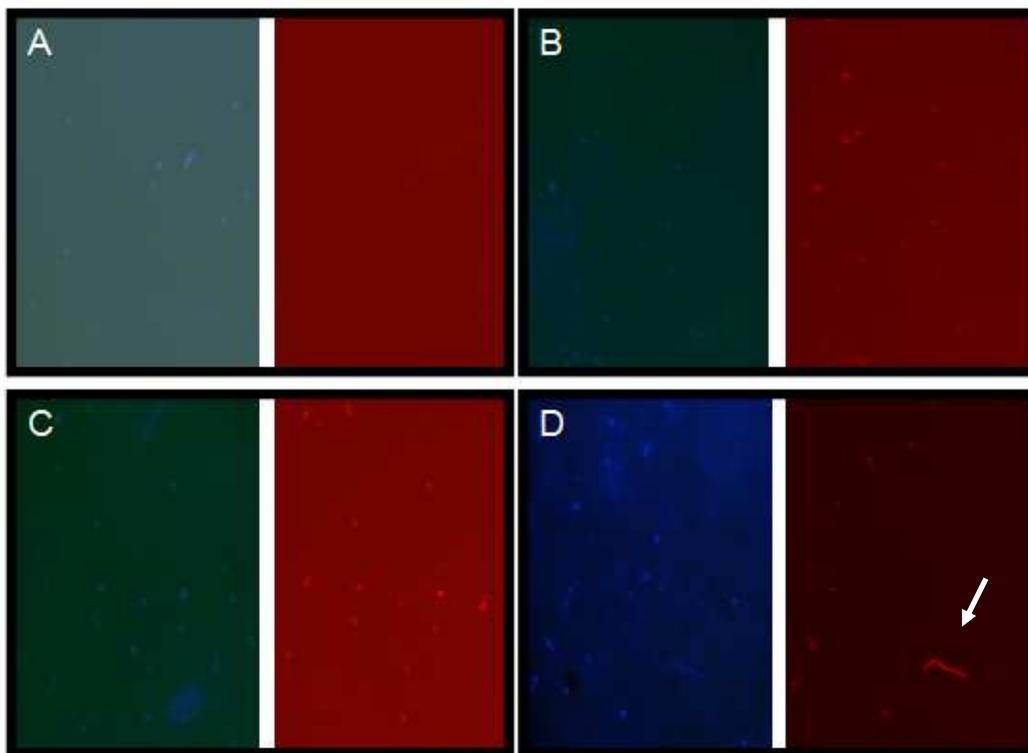
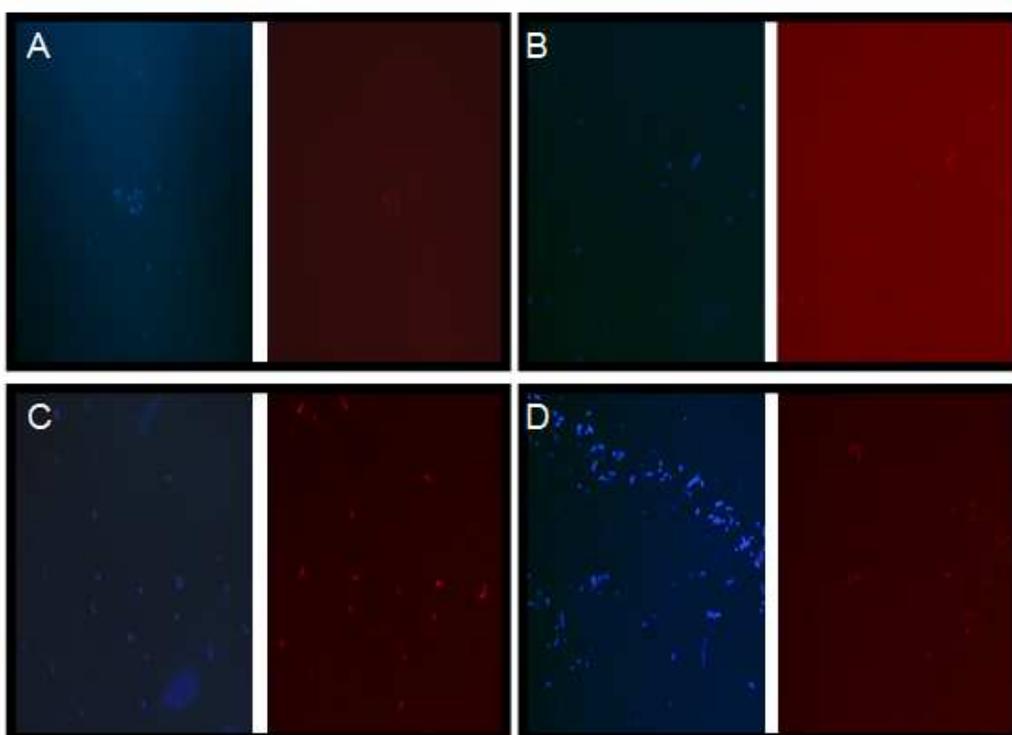


Figura 7. A) Abundancia de bacterias totales B) Abundancia de la población de *E. coli* inoculada en ambos tratamientos del experimento. (\*) diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al tiempo cero.



**Figura 8.** Fotografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia de bacterias hibridadas con la sonda EnterbactB en el tratamiento estático. Las imágenes azules muestran la tinción con DAPI y las rojas con Cy3. A) Tiempo 0h B) Tiempo 2h C) Tiempo 4h D) Tiempo 8h de incubación. La flecha indica una bacteria filamentososa.



**Figura 9.** Fotografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia para bacterias hibridadas con la sonda EnterbactB en el tratamiento remoción. Las imágenes azules muestran la tinción con DAPI y las rojas con Cy3. A) Tiempo 0h B) Tiempo 2h C) Tiempo 4h D) Tiempo 8h de incubación.

## Determinación de la concentración de materia orgánica y sólidos en suspensión en el agua del microcosmo

El contenido de MOP y SS del agua de la cachimba empleada como modelo para el presente trabajo (contenido *in situ*) no se pudo determinar debido a inconvenientes en la metodología.

El contenido de MOP y SS en el agua de los microcosmos varió entre los distintos tratamientos. En el estático ocurrió una leve disminución a las 2 horas de incubación, seguido de un aumento a las 4 horas. Al final del tratamiento estático la concentración de materia orgánica y de sólidos en suspensión disminuyó (Figura 10 A). Por otra parte, en el tratamiento remoción la concentración de MOP y SS disminuyó a partir de las 2 horas de incubación respecto al tiempo cero (Figura 10 B).

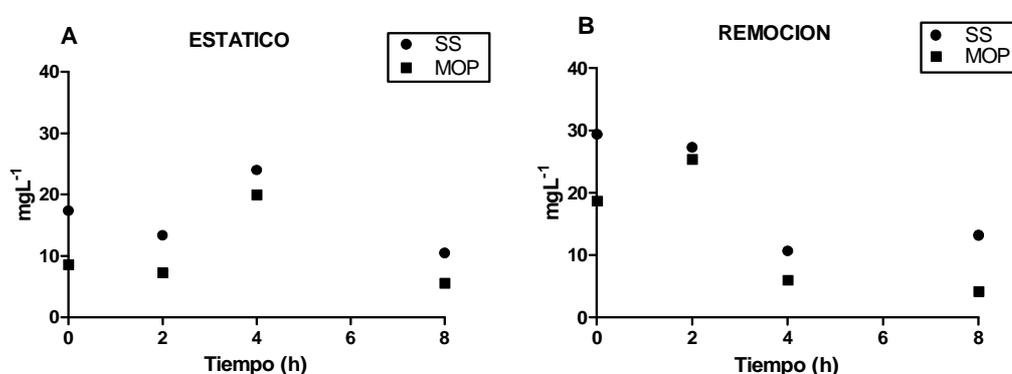


Figura 10. Contenido de materia orgánica particulada y sólidos en suspensión.

## Determinación del estado de viabilidad celular de la población de *E. coli*

La abundancia de bacterias viables se calculó a partir de la diferencia entre las totales y las no viables, teñidas con IP. Al igual que lo sucedido con la población de *E. coli*, el tratamiento estático promovió el crecimiento de las bacterias viables durante las primeras 4 horas de incubación respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 11 A). Por otra parte, durante toda la incubación del tratamiento remoción la abundancia de las bacterias viables aumentó de manera sostenida y significativa en relación al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 11 B). En ambos tratamientos se observó que la abundancia de las bacterias viables fue superior a la de *E. coli* (Figura 11 A y B). De forma similar, se determinó que ca. del 50% de la comunidad bacteriana estudiada correspondía a células viables (Figura 13). Se observó que la abundancia de bacterias no viables siguió la misma tendencia que las viables (Figura 12). Cuando se cuantificaron las bacterias teñidas con IP se observó que a las 4 horas de incubación del tratamiento estático las mismas aumentaron significativamente respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 12 A); mientras que en el remoción lo hicieron durante todo el tratamiento (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 12 B). En la Fig. 13 se puede observar que en el tratamiento remoción, si bien la abundancia de las células totales aumentó con el tiempo de incubación (Figura 12 B), el porcentaje de éstas que se son viables disminuye.

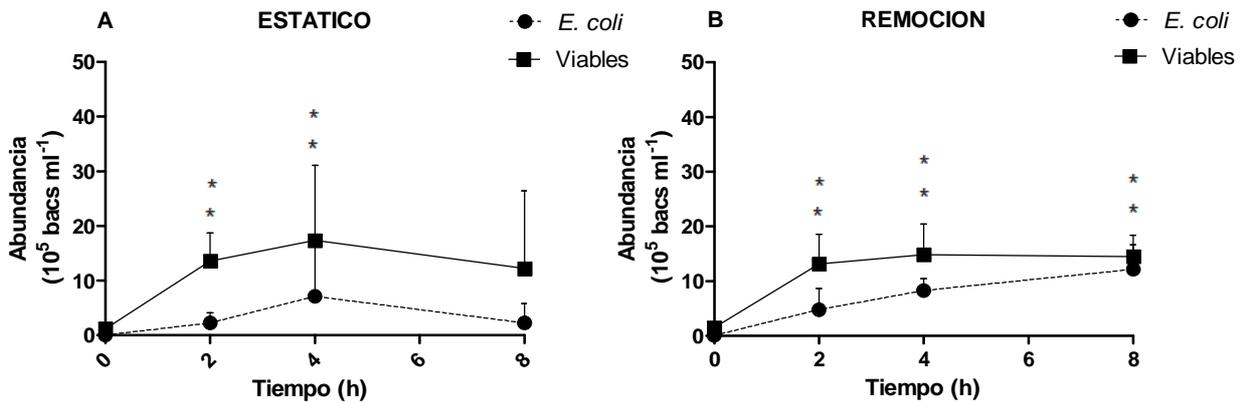


Figura 11. Abundancia de la población de *E. coli* indicadora y de bacterias viables calculadas a partir de la tinción con IP en A) tratamiento estático B) tratamiento remoción. (\*), diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al tiempo cero.

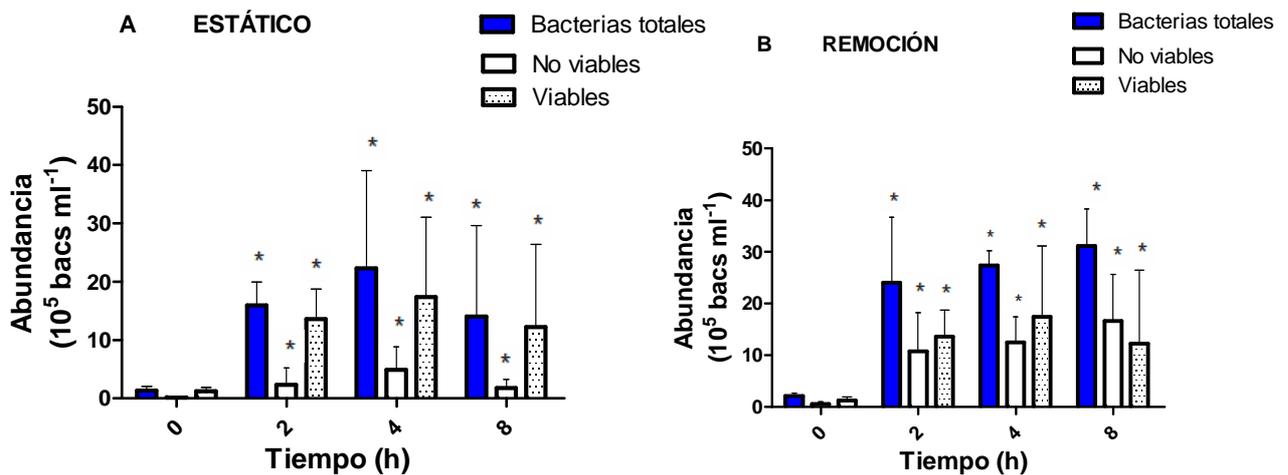


Figura 12. Abundancia bacteriana total y de bacterias no viables en A) tratamiento estático B) tratamiento remoción. (\*), diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al tiempo cero.

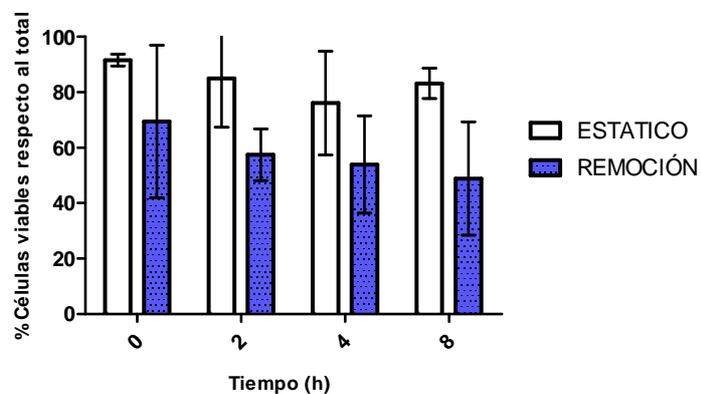


Figura 13. Porcentaje de bacterias viables respecto al total para los dos tratamientos del experimento.

## Determinación de la composición de la comunidad bacteriana

Respecto a la contribución de cada grupo filogenético a la composición del ensamblaje bacteriano se observó que al inicio de ambos tratamientos (t=0 h) el mismo estaba compuesto mayoritariamente por Proteobacteria (principalmente por Betaproteobacteria), mientras que Bacteroidetes y Actinobacteria contribuyeron en menor medida a la composición de la comunidad bacteriana inicial (Figura 14). Por otra parte, al final de las incubaciones de ambos tratamientos (t=8 h) la comunidad bacteriana continuó estando representada por miembros de los cinco grupos filogenéticos analizados aunque ocurrieron cambios en la contribución de cada uno de ellos a la composición de la comunidad total (Figura 14).

Los grupos que alcanzaron las abundancias más altas en el tratamiento estático fueron (en orden decreciente) Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria. En el tratamiento remoción en cambio, las Gammaproteobacteria presentaron las abundancias más elevadas, seguidas de las Betaproteobacteria y Alphaproteobacteria (Figura 14). El filo Bacteroidetes aumentó su abundancia relativa respecto al inicio del tratamiento (Figura 14).

### Abundancias relativas por grupo

#### Proteobacteria

La subclase Alphaproteobacteria presentó su máxima abundancia relativa a las 4 horas de incubación en ambos tratamientos (Figura 14 A). En ambos casos representó un aumento significativo respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). A pesar de que en las últimas cuatro horas de incubación del tratamiento remoción la tendencia de las mismas fue a disminuir, dicha disminución no fue significativa respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p = 0,512$ ). En el tratamiento estático hubo una disminución significativa respecto al tiempo tres (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

La subclase Betaproteobacteria presentó valores máximos de abundancia relativa en diferentes tiempos de incubación para los dos tratamientos. En el estático ocurrió a las 2 horas mientras que en el tratamiento remoción ocurrió a las 8 horas (Figura 14 B). Ambos tratamientos estimularon el crecimiento de las Betaproteobacteria durante toda la incubación respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

Las Gammaproteobacteria tuvieron su máxima abundancia relativa a las 4 y 8 horas en los tratamientos estático y remoción, respectivamente (Figura 14 C.1). Como era de esperar, su dinámica fue similar a la población de *E. coli* (que es una Gammaproteobacteria), aumentando su abundancia relativa durante la incubación respecto al tiempo cero en el tratamiento remoción (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) y disminuyendo significativamente al final de la incubación en el tratamiento estático (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ). Cuando se calculó el porcentaje de Gammaproteobacteria correspondiente a *E. coli* (Figura 14 C.2) se observó que a las 2 horas del tratamiento remoción y a las 4 horas del estático el 100 % la población de Gammaproteobacteria correspondió a la población de *E. coli* inoculada.

### Actinobacteria

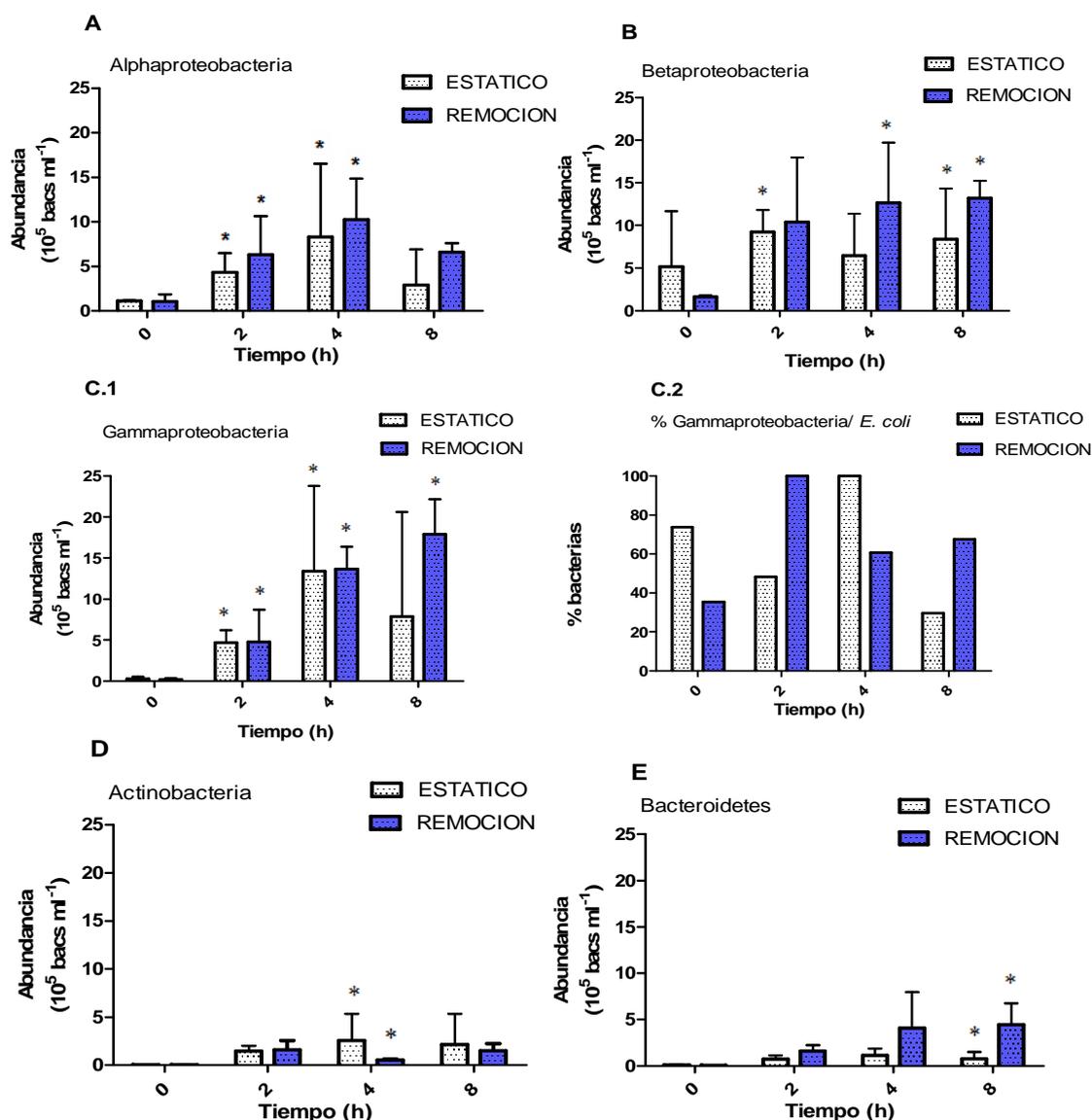
Ambos tratamientos promovieron el crecimiento de las Actinobacteria durante las 8 horas de incubación, a las 4 horas de incubación en ambos casos se observó un aumento significativo en su crecimiento respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 14 D).

### Bacteroidetes

Ambos tratamientos favorecieron el crecimiento de miembros del filo Bacteroidetes durante toda la incubación (Figura 14 E). En ambos casos, al final de la incubación (8 horas) se observó un aumento significativo en su abundancia relativa respecto al tiempo cero (Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ ).

### Eubacteria

En ambos tratamientos la detección realizada con la sonda dirigida al dominio Eubacteria fue baja, probablemente debido a inconvenientes metodológicos. Por esta razón, los valores de la hibridación con la sonda EUB338 no se consideraron en el análisis de los resultados.



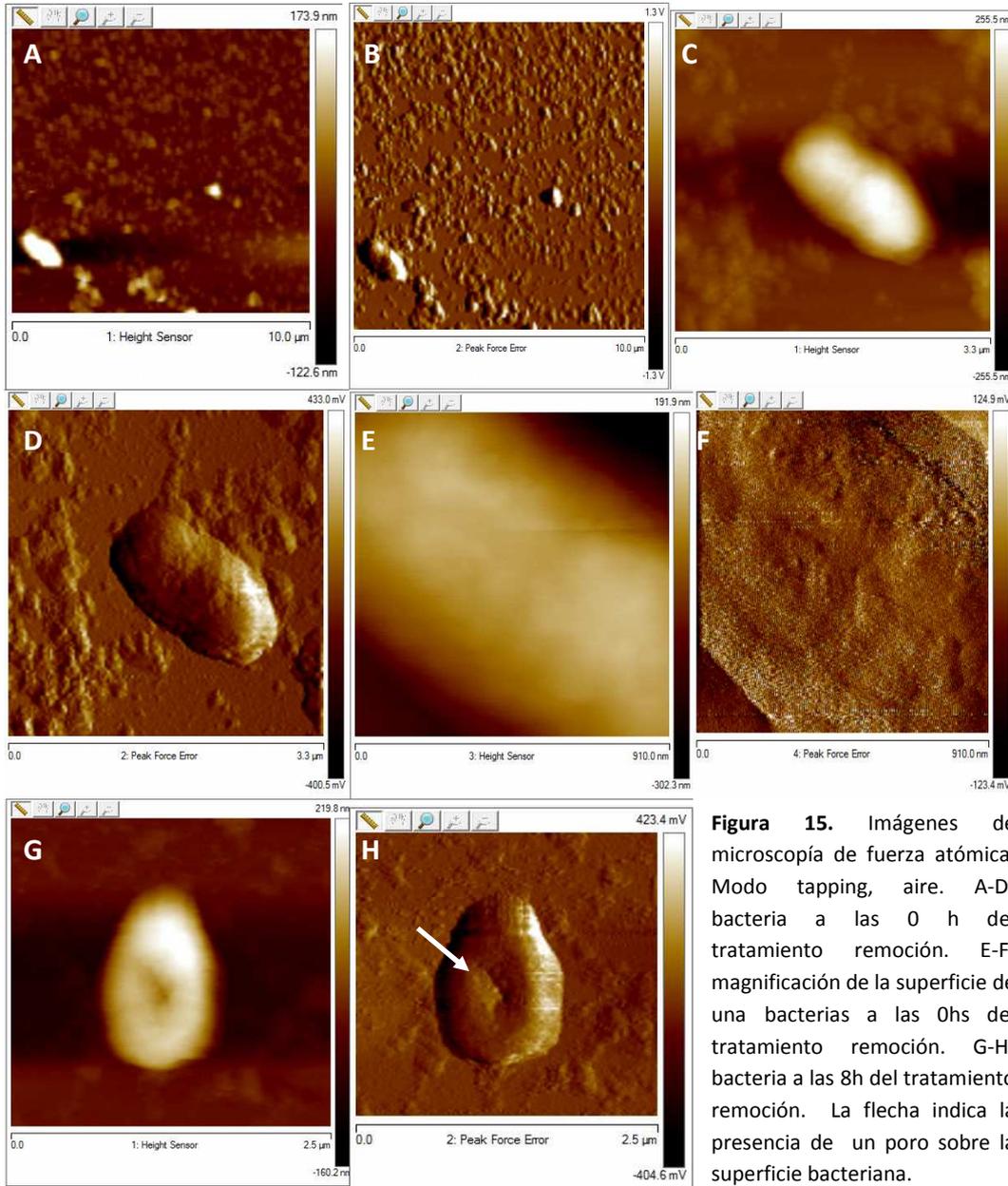
**Figura 14.** Abundancia de las subclases de Proteobacteria (A, B y C.1), de los filos Actinobacteria (D) y Bacteroidetes (E) para los dos tratamientos del experimento. En C.2 se muestra el porcentaje de Gammaproteobacteria correspondiente a la especie *E. coli*. (\*), diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al tiempo cero.

### Evaluación de la validez del empleo de ioduro de propidio como indicador de viabilidad celular

Cuando se cuantificaron las células tratadas con lisozima que incorporaban IP para confirmar que éste penetró en las células dañadas, los resultados mostraron que el 100% de las bacterias permeabilizadas con lisozima efectivamente se tiñeron con el colorante (datos no presentados).

Adicionalmente se procedió a evaluar la integridad de las membranas plasmáticas de células teñidas con IP mediante MFA. En las imágenes de una célula obtenidas con este microscopio al inicio de la incubación en el tratamiento remoción (Figura 15 A-F) no se observó

algún signo de daño celular. Por otra parte, en las imágenes de fuerza atómica del mismo tratamiento pero a las 8 horas de incubación (Figura 15 G-H), se observó una célula con una característica particular sobre su superficie, similar a un poro. No se pudo determinar inequívocamente si esa bacteria se encontraba teñida con IP debido a limitaciones metodológicas.



**Figura 15.** Imágenes de microscopía de fuerza atómica. Modo tapping, aire. A-D) bacteria a las 0 h del tratamiento remoción. E-F) magnificación de la superficie de una bacterias a las 0hs del tratamiento remoción. G-H) bacteria a las 8h del tratamiento remoción. La flecha indica la presencia de un poro sobre la superficie bacteriana.

## DISCUSIÓN

---

### **Efecto del tiempo de residencia del agua sobre la abundancia de la población de *Escherichia coli***

La conservación de la calidad del agua de pozos alimentados con agua subsuperficial (cachimbas) en el Área Protegida Cabo Polonio es motivo de preocupación tanto para sus habitantes como para visitantes y gestores. En este trabajo se analizó si el tiempo de residencia del agua (entendiendo como el ingreso o no de agua del subsuelo) modifica la dinámica (abundancia y viabilidad) de las comunidades bacterianas acuáticas. Se estudió el comportamiento de una población de *E. coli* ya que la misma se emplea frecuentemente como indicadora de contaminación fecal en el agua (Schraft y Watterworth, 2005) y se estudió su abundancia y viabilidad celular mediante métodos alternativos a los de rutina. Se demostró que las condiciones de incubación del tratamiento remoción estimularon su crecimiento, mientras que las del estático lo comprometieron.

En el tratamiento remoción, el crecimiento durante toda la incubación de la población de *E. coli* usada como indicadora probablemente se debió a la incorporación de agua de la cachimba prefiltrada al microcosmo, la cual contenía nutrientes y materia orgánica disuelta. Esto se confirma con lo observado para el contenido de MOP, que disminuyó en estas condiciones de incubación probablemente debido a su consumo por las bacterias y a la lisis viral, que contribuye a la transformación de la materia particulada en disuelta (Noble y Fuhrman, 1999). Por otra parte, en el tratamiento donde no se incorporó agua de la cachimba (estático) el crecimiento bacteriano disminuyó. Por lo tanto, los resultados indican que el agua de la cachimba contiene MO y nutrientes responsables de estimular el crecimiento bacteriano dentro del microcosmo. Estos nutrientes podrían provenir de las filtraciones de agua desde los pozos sépticos, tal como se propone en la hipótesis de este trabajo.

Como se ha descrito anteriormente, el incremento relativo de nutrientes orgánicos disueltos en los sistemas acuáticos contribuye al aumento de la abundancia de los procariontes heterótrofos (Cotner et al., 2002). A su vez, la manipulación y prefiltración del agua pudo ocasionar daño celular (Ferguson et al., 1984) y por tanto, la disponibilidad de nutrientes para las bacterias confinadas dentro del microcosmo probablemente aumentó. Además, dado a que la cachimba con la cual se trabajó se encontraba destapada es probable que el crecimiento de algas se haya favorecido por la incidencia de la luz y la presencia de nutrientes. Por lo tanto, la liberación de MOD por estos organismos también puede haber estimulado el crecimiento bacteriano (Cole et al., 1982; Cole et al., 1988).

La disminución de la abundancia de *E. coli* observada al final de la incubación del tratamiento estático podría ser efecto de la depredación por protistas (principalmente por nanoflagelados y ciliados heterótrofos) (Sherr y Sherr, 2002) y/o a la lisis viral (Weinbauer y Höfle, 1998; Weinbauer y Rassoulzadegan, 2004), ya que en este tratamiento no se controló el efecto de la bacterivoría. Junto a la lisis viral, estos factores son los principales responsables de provocar la reducción de las abundancias bacterianas en los ecosistemas acuáticos (Fuhrman y

Noble, 1995). Dado que en este tratamiento se observó la presencia de bacterias filamentosas y a que la mayoría de los filamentos exceden los tamaños que los depredadores pueden ingerir (o son ingeridos por estos a tasas más lentas), la formación de los mismos suele considerarse un mecanismo adoptado por las bacterias para evadir de la depredación por protistas (Pernthaler, 2005) y por tanto, un indicador de que ha ocurrido depredación. Además como en este tratamiento no se incorporó agua de la cachimba al microcosmo (no se recambió el medio de cultivo artificial) y el crecimiento bacteriano disminuyó, los resultados permiten inferir una vez más que el agua de la cachimba contenía nutrientes y MO.

Si bien el crecimiento de las bacterias entéricas en los sistemas acuáticos naturales depende principalmente de la disponibilidad de nutrientes, de las condiciones fisicoquímicas del agua como temperatura, pH, salinidad (Barcina et al., 1990) así como de la bacterivoría (Williams et al., 2008) y de las infecciones virales (Weinbauer y Höfle, 1998), es claro que los distintos factores actuaron de manera diferencial sobre la población de *E. coli* en los dos tratamientos del experimento. Por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes en el tratamiento remoción estimuló el crecimiento de *E. coli* durante toda la incubación (efecto *bottom-up*), mientras que la presencia de depredadores al final del estático lo comprometieron (efecto *top-down*).

### **Estudio de la viabilidad bacteriana mediante una técnica alternativa al recuento en placa**

Los estudios de viabilidad celular son relevantes para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua ya que permiten detectar la presencia de bacterias patógenas viables, las cuales representan un riesgo para la salud humana (Zoppini y Amalfitano, 2011). En base a ello, en el presente trabajo se analizó la viabilidad bacteriana en el agua de los microcosmos empleando un método alternativo al recuento en placa (tinción con yoduro de propidio y microscopía de epifluorescencia).

En primer lugar se confirmó mediante permeabilización con lisozima que el protocolo empleado para la tinción con IP es adecuado, ya que se observó que todas las bacterias permeabilizadas incorporaron el colorante. La propuesta inicial consistía en determinar simultáneamente si las células de *E. coli* marcadas con la sonda estaban teñidas con IP y de esta manera se obtendrían datos de identificación, abundancia y viabilidad para cada célula. Sin embargo, dado que el IP y la sonda emiten fluorescencia a la misma longitud de onda (mismo color) no fue posible discriminar si las células de *E. coli* estaban marcadas con el colorante. Sin embargo, debido a la relevancia de la membrana plasmática en procesos claves de la división celular (síntesis activa de proteínas y ácidos nucleicos) (Madigan et al., 2004) y al crecimiento que mostró la población indicadora, se infirió que las *E. coli* que crecieron en ambos tratamientos no tenían comprometida su membrana y por tanto no deberían estar teñidas con IP. Sin embargo, como se explicó anteriormente esto no se pudo comprobar. Además, resultó llamativo que la abundancia de las bacterias no viables (las teñidas con IP) presentara una tendencia similar a las viables, ya que esto indicaría que a medida que crece la población aumenta el número de células que tienen su viabilidad comprometida. Esto sugiere que las células viables deberían tener tasas de crecimiento muy altas a la temperatura empleada para la incubación (17 °C). Lamentablemente no es posible realizar más

especulaciones al respecto, ya que la aproximación empleada tiene limitaciones. Una de ellas fue que, como ya se mencionó, no se pudo determinar la presencia de *E. coli* y la tinción con IP en la misma célula. Esto se debió a que la selección del fluoróforo para marcar la sonda (Cy3) se basó en que fuera adecuado para los filtros que tiene el microscopio empleado (se intentó marcar la sonda con fluoresceína que es verde, pero la señal obtenida era muy baja) pero emite fluorescencia en el mismo canal que el IP (ambos en el rojo). Por tanto, no se pudo cuantificar simultáneamente la hibridación y la viabilidad, sino que se hizo en preparaciones separadas. Esto impidió determinar las viables directamente por conteo y no por diferencia entre el total y las no viables. Actualmente se está considerando el uso de otro fluoróforo para la sonda u otro colorante de ácidos nucleicos que pueda ser empleado en el ensayo de viabilidad celular.

Otra limitación es inherente al empleo de IP como indicador de células que han perdido su integridad celular (Shi et al., 2007; Williams et al., 1998). Se ha descrito que este colorante puede ingresar a las células no solo cuando la membrana plasmática está dañada, sino también en otras circunstancias como ser en células viables que tienen modificada su permeabilidad a este colorante (Shi et al., 2007). Un caso así podría ocurrir en células que se encuentran en división y está elongando su pared. En este sentido, los estudios de Huang y colaboradores realizados en el año 2008 demostraron que durante su división las bacterias experimentan diversos cambios morfológicos donde su pared y membrana plasmática se vuelven plásticas y flexibles. Por lo tanto, algunas bacterias que modificaron su permeabilidad al IP como consecuencia de cambios morfológicos típicos del proceso de división celular y crecimiento, se pueden haber cuantificado como células no viables y de esta manera, la abundancia de las mismas se puede haber sobreestimado.

Por tanto, la técnica alternativa al recuento en placa propuesta en este trabajo para evaluar el crecimiento de *E. coli* en el sistema experimental empleado debería ser ajustada en relación a la determinación de la viabilidad celular con IP.

### **Evaluación de células teñidas con yoduro de propidio mediante MFA**

Dado lo explicado anteriormente, decidimos comenzar a analizar detalladamente mediante MFA la pared bacteriana en aquellas células teñidas con IP y por tanto teóricamente deberían presentar síntomas de daño. Las imágenes obtenidas (Figura 15 A-E) mostraron que las bacterias en el inicio de las incubaciones son similares a las reportadas por otros autores para células de *E. coli* sanas (Braga y Ricci., 1998, Li et al., 2006., Formosa et al., 2012), mientras que las imágenes de las bacterias al final del tratamiento remoción son similares a las publicadas por Li y colaboradores (2006). Estos autores analizaron el efecto de un antibiótico peptídico en *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante MFA y encontraron que el agregado de 0,25  $\mu\text{M}$  del antibiótico durante 15 minutos a un cultivo puro de *E. coli* provocaba la formación de una hendidura sobre su superficie, similar a la que aparece en nuestras imágenes (Figura 15 G y H).

En la actualidad seguimos abocados a la tarea de adquirir más experiencia en la obtención y análisis de imágenes de MFA, con el fin de contar con precisión estadística y dilucidar si las características observadas en las bacterias se presentan en todas las bacterias teñidas con IP. Se podría así confirmar si el empleo de este colorante como vital es adecuado.

## **Efecto del tiempo de residencia del agua sobre la dinámica de la comunidad bacteriana**

La composición de la comunidad bacteriana se analizó mediante CARD-FISH empleando las sondas generales para los distintos grupos del dominio Bacteria anteriormente descritas. En ambos tratamientos se detectaron miembros de los cinco grupos filogenéticos analizados comprobándose que el agua de la cachimba posee una composición bacteriana similar a la de un ecosistema de agua dulce (Glöckner et al., 1999). Si bien se observó que en ambos tratamientos los distintos grupos ensayados se comportaron de manera similar, todos tuvieron variaciones dentro de cada tratamiento. Se determinó que las condiciones de incubación del tratamiento remoción estimularon en mayor medida el crecimiento de miembros del grupo Proteobacteria y Bacteroidetes, mientras que no fue así para el caso de Actinobacteria. Probablemente el crecimiento bacteriano se debió al ingreso sostenido de nutrientes y materia orgánica al microcosmo junto al agua de la cachimba añadida, como se indicó anteriormente el contenido de MOP disminuyó en estas condiciones de incubación. Estos resultados coinciden con otros reportados por Teira y colaboradores (2011) donde se demostró mediante CARD-FISH que el ingreso de nutrientes orgánicos a microcosmos conteniendo agua del río Vigo y de la costa de la península Ibérica, modificó la estructura de la comunidad bacteriana analizada. De manera similar a lo observado por Teira y col. en el presente trabajo se demostró que los Bacteroidetes aumentaron su abundancia relativa respecto a las condiciones iniciales. La disminución de la concentración de MOP observada en las últimas cuatro horas de incubación de este tratamiento, concomitante al aumento en la abundancia relativa de Bacteroidetes sugiere que este filo bacteriano habría utilizado esa forma de MO como fuente de materia y energía. Esto coincide con lo anteriormente descrito para este filo que generalmente se asocia a la degradación de moléculas complejas (Kirchmann., 2002 en Pradeep y Sime-Ngando, 2008) así como de partículas en suspensión (DeLong et al., 1993; Nold y Zwart, 1998).

Por otra parte, las condiciones de incubación del tratamiento estático aumentaron las abundancias relativas de todos los grupos bacterianos analizados respecto al inicio de las incubaciones. Sin embargo, el efecto de los depredadores (Sherr y Sherr, 2002) y de la infección viral (Weinbauer y Rassoulzadegan, 2004) que probablemente fue mayor en este tratamiento que en el remoción, fue el responsable de provocar la disminución selectiva de las Alphaproteobacteria hacia el final de ambos tratamientos. A pesar de que las Gammaproteobacteria dominaron en ambas condiciones de incubación, esto se debió a la población de *E. coli* inoculada y no a una variación de la población de Gammaproteobacteria natural.

En suma, los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la abundancia y composición de la comunidad bacteriana coinciden con la distribución anteriormente descrita para los principales filos bacterianos en los ambientes acuáticos (Nold y Zwart, 1998). Asimismo, como se demostró previamente, la prefiltración y manipulación del bacterioplancton durante enriquecimientos (Suzuki, 1999), diluciones (Fuchs et al., 2000) e incubaciones en micro y mesocosmos genera cambios en la composición taxonómica de las

mismas (Schäfer et al., 2000, Schäfer et al., 2001). A su vez, esto puede deberse a que distintos grupos bacterianos podrían tener roles diferentes en la asimilación y en la captación de materia orgánica y nutrientes. Si bien los micro y mesocosmos introducen sesgos en el análisis de las comunidades microbianas acuáticas respecto a los ambientes naturales, el hecho de confinar el sistema de estudio en un recipiente permite conocer cómo los procesos ambientales afectan temporalmente la estructura, la diversidad y la actividad de las comunidades microbianas acuáticas (Pradeep y Sime-Ngando, 2008).

## CONCLUSIONES

---

En el presente trabajo se estudió el efecto que tienen los cambios en el tiempo de residencia del agua de pozo sobre la dinámica (abundancia y viabilidad) de una población de *E. coli* mediante técnicas moleculares independientes al cultivo bacteriano. Se demostró que los cambios en el tiempo de residencia del agua afectaron la abundancia y composición de la comunidad bacteriana planctónica.

En primer lugar se demostró el crecimiento del microorganismo empleado como indicador, *E. coli*, debido al ingreso de agua conteniendo altas concentraciones de materia orgánica. El origen de esta materia orgánica serían los pozos sépticos localizados a pocos metros de distancia de las cachimbas, así como las algas que crecen dentro de las mismas. Por lo tanto, se puede concluir que la cercanía entre cachimbas y pozos sépticos favorecería la filtración de agua con materia orgánica y nutrientes, así como también con coliformes fecales, desde estos últimos.

En segundo lugar, se constató que los tratamientos realizados no indujeron cambios en el ensamblaje bacteriano, aunque se observaron variaciones dentro de cada tratamiento. Todos los grupos bacterianos analizados aumentaron significativamente su abundancia relativa entre las 2 y 4 h de incubación y la mantuvieron hasta el final del experimento, excepto Alphaproteobacteria, que disminuyó hacia el final del tratamiento estático. El grupo que mostró menor abundancia relativa fue Actinobacteria.

El ensayo de viabilidad celular empleado en el presente trabajo como alternativa al recuento en placa resultó en una aproximación adecuada para conocer el estado de viabilidad de la población indicadora. Sin embargo, surgieron algunas incertidumbres acerca del alcance de la aplicación del IP como tinción vital, principalmente en lo que respecta a bacterias que se encuentran dividiéndose. En este sentido, se desprenden las principales perspectivas del trabajo. Por otra parte, la investigación sobre el estado de viabilidad bacteriana realizada mediante MFA constituye la primera contribución a estudios de este tipo en nuestro país.

## APORTES A LA GESTIÓN DEL AGUA DE LAS CACHIMBAS EN EL CABO POLONIO

---

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y considerando el riesgo que tiene para la salud pública el consumo de agua contaminada con coliformes fecales (WHO, 1993) se sugiere que no se utilice el agua de las cachimbas del Cabo Polonio para consumo humano y que se realice un tratamiento de la misma en caso de utilizarla en actividades domésticas y/o comerciales. El mismo podría incluir hervir el agua a temperaturas cercanas a la de ebullición (100 °C), dado que los coliformes fecales no sobreviven a tales temperaturas (Barcina et al., 1990), filtrar el agua previo a su utilización (preferentemente empleando carbono activado) y/o tratarla con hipoclorito de manera de reducir la carga microbiana.

Respecto a la ausencia de ordenamiento territorial existente en el Cabo Polonio y por lo cual la mayoría de los pozos sépticos se localizan a pocos metros de distancia de las cachimbas, el presente trabajo propone que se estudie la posibilidad de reubicarlos, al menos a uno de los pozos, de manera de disminuir la contaminación del agua de las cachimbas. Asimismo, sería interesante considerar la implantación de pozos sépticos alternativos como ser humedales y pozos secos en el Plan de manejo del sitio. A su vez, la preservación de la vegetación nativa de la zona aporta a la gestión del agua de las cachimbas, ya que la misma podría actuar como filtro biológico para eliminar o reducir la carga de nutrientes proveniente de la escorrentía de los pozos sépticos. De esta manera, al disminuir los nutrientes el agua de las cachimbas sería menos susceptible de desarrollar crecimiento bacteriano o algal y por tanto, el riesgo de contaminación microbiana disminuiría.

## PERSPECTIVAS

---

Para profundizar en la utilidad y validez del empleo del IP como indicador de viabilidad celular se realizará un ensayo experimental siguiendo el crecimiento de un cultivo puro de *E. coli* al cual se le agregarán sustancias que dañan específicamente la pared celular (por ej. antibióticos). Se teñirán con IP y se evaluará la abundancia relativa de bacterias teñidas mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo. Asimismo, las células teñidas se obtendrán por separación celular (*sorting*) y se observarán al microscopio de fuerza atómica para analizar su pared. De esta manera, se conocerá si las bacterias que se encuentran en diferentes fases del crecimiento celular son capaces de incorporar o no al colorante.

Por otra parte, sería conveniente repetir el experimento en otra época del año, por ejemplo, cuando la concurrencia de personas al Cabo Polonio incrementa (diciembre, enero, febrero o marzo). De esta manera, se podría evaluar el efecto que tiene el aumento de las descargas domésticas a los pozos sépticos y la consecuente filtración de agua contaminada con altas concentraciones de materia orgánica, nutrientes inorgánicos y coliformes fecales a las

cachimbas. También sería interesante realizar un monitoreo de la calidad microbiológica del agua de las cachimbas del Polonio involucrando más pozos de agua y otros bioindicadores (macroinvertebrados, por ejemplo) junto a otros parámetros como la geomorfología del sitio de estudio, de manera de obtener un análisis más profundo.

A su vez, sería interesante incluir estudios de la calidad del agua de cachimbas localizadas en zonas potencialmente no contaminadas (zonas de vegetación por ejemplo). Asimismo, la caracterización del agua de los pozos sépticos (incluyendo estudios que permitan predecir la dirección del flujo de las aguas servidas) y de la napa freática tanto en zonas contaminadas como en otras no afectadas, sería relevante para determinar si los pozos negros efectivamente constituyen una fuente de nutrientes, MO y coliformes fecales para las cachimbas.

## BIBLIOGRAFIA

---

- **Allison D., Mortenen N., Sullivan C., Doktycz., M., 2010.** Atomic Force Microscopy of biological simples. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2: 618-634.
- **Álvarez S., 2005.** La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. Ecosistemas. 14: 17-29.
- **Amann R. I, Krumholz L., Stahl D.A., 1990.** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. Journal of Bacteriology. 172: 762-770.
- **Amann R., Ludwig W., Schleifer K-H., 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews. 59: 143-169.
- **APHA, AWWA, AEF.,1998.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> ed. Washington, DC.
- **Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray S., Meyer-Reil A., Thingstad F., 1983.** The ecological role of water column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series. 10:257-263.
- **Barcina I., González J.M, Iriberry J., Egea L., 1990.** Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. Journal of Applied Bacteriology. 68: 189-198.
- **Barreneche E., 2012.** “Cabo Polonio bajo riesgo ambiental”. Informe. El Plan de manejo del Parque Nacional Cabo Polonio, encomendado por el MVOTMA y la Intendencia de Rocha revela situaciones críticas del balneario y propone severas medidas. Diario El País, publicado el 27 Julio 2012.
- **Berney M., Vital M., Hülshof I., Weilenmann H.U., Egli T., Hammes F., 2008.** Cultivation-independent assesment of Microbial viability in drinking water. Water research. 42: 4010-4018.
- **Bonilla S., Aubriot L., 2009.** Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión. Capítulo 1. Biología, floraciones y distribución de las cianobacterias. UNESCO.
- **Braga P.C, Ricci D., 1998.** Atomic Force Microscopy: Application to Investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefozidime. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42: 18-22.
- **Breeuwer P., Abee T., 2000.** Assesment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. International Journey of Food Microbiology. 55: 193-200.
- **Caron G.N., Stephens P., Badley R.A., 1998.** Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. Journal Applied Microbiology. 84: 988-998.

- **Cho J.C., Tiedji J.M., 2002.** Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1425-1430.
- **Cole J.J., Likens G.E., Strayer D.L., 1982.** Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology Oceanography*. 27: 1080-1090.
- **Cole J.J., Findlay S., Pace M.L., 1988.** Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology*. 43: 1-10.
- **Conde D., 2009.** Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión. Capítulo 3. Eutrofización, cambio climático y cianobacterias. UNESCO.
- **Cotner J.B., Biddanda B.A., 2002.** Small Players, Large Role: Microbial influence on Biogeochemical Processes in Pelagic Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*. 5: 105-121.
- **Cruz M., Castrellón-Urbe J., 2005.** Microscopio de Fuerza Atómica. ENIVE: Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica, 17-18 marzo del 2005. Centro de investigación en ingeniería y ciencias aplicadas, CIICAp, México.
- **CYTED. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. 2003.** Capítulo 20. Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas.
- **DeLong E.F., Franks D.G., Alldredge A.L., 1993.** Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology Oceanography*. 38: 924-934.
- **DeLong E.F., Wu K.Y., Prezelien B.B., Jovine R.V.M., 1994.** High abundance of *Archaea* in antarctic marine picoplankton. *Nature*. 371: 695-697.
- **Diaper J.P., Edwards C., 1994.** Survival of *Staphylococcus aureus* in lakewater monitored by flow cytometry. *Microbiology*. 140: 35-42.
- **Doktycz M. J., Sullivan C.J., Hoyt P.R., Pelletier D.A., Wu S., Allison D.P., 2003.** AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy*. 97: 209-216.
- **Eickhorst T., Tippkötter R., 2008.** Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 1883-1891.
- **Environmental Protection Agency (EPA), 2003.** Volunteer Estuary Monitoring. A Methods Manual. Cap. 10, 17.
- **Epstein S.S., Rossel J., 1995.** Methodology of in situ grazing experiment: evaluation of a new vital dye for preparation of fluorescently labelled bacteria. *Marine Ecology Progress Series*. 128: 143-150.

- **FAO., 1997.** Capítulos 1,3,4. Contaminación agrícola de los recursos hídricos. Págs. 1020-4393.
- **FAO, 2002.** Agua y cultivos. Logrando el uso óptimo del agua en la agricultura.
- **FAO., 2005.** Optimización de la humedad del suelo para la producción vegetal. El significado de la porosidad del suelo. “El ciclo hidrológico”. Boletín de suelos de la FAO. Vol. 79. Pág.9.
- **Farjalla V.F., Marinho C.C., Faria B.M., Amado A.M., Esteves F., Bozelli R.L., Giroldo D., 2009.** Synergy of Fresh and Accumulated Organic Matter to Bacterial Growth. *Microbial Ecology*. 57: 657-666.
- **Fellman J.B., Hood E., Spencer R.G.M., 2010.** Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnological Oceanography*. 55: 2452-2462.
- **Ferguson R.L., Buckley E., Palumbo A., 1984.** Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 49-55. quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3618-3623.
- **Flegger J.W., Carman K.R., Nisbet R.M., 2003.** Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*. 317: 207-233.
- **Formosa C., Grare M., Duval R.E., Dague E., 2012.** Nanoscale effects of antibiotics on *P. aeruginosa*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8: 12-16.
- **Francisco R.L., Mah R.A., Rabin A.C., 1973.** Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Transactions of the American Microscopical Society*. 92: 416-421.
- **Fuhrman J.A., Suttle C.A., 1993.** Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*. 6: 51-63.
- **Fuhrman J.A, Noble R.T., 1995.** Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology Oceanography*. 40: 1236-1242.
- **Fuchs B.M., Zubkov M.V., Sahn K., Burkill P.H., Amann R., 2000.** Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental Microbiology*. 2: 191-201.
- **Glöckner F.O., Fuchs B.M., Amann R., 1999.** Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3721-3726.
- **Hoefel D., Grooby W.L., Monis P.T., Andrew S, Saint C.P., 2003.** Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiology Methods*. 55: 585–597.

- **Huang K.C., Mukhopadhyay R., Wen B., Gitai Z., Wingreen N., 2008.** Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. PNAS. 105: 19282-19287.
- **Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D., 2002.** Manual of Environmental Microbiology, second ed. ASM Press, Washington, DC.
- **Keil R.G., Kirchman D.L., 1991.** Contribution of dissolved amino acids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. Marine Ecology Progress Series. 73: 1–10.
- **Langenheder S., Kisand V., Wikner J., Tranvik J., 2003.** Salinity as structuring factor for the composition and performance of bacterioplankton degrading riverine DOC. FEMS. Microbiological Ecology. 45: 189-202.
- **Lebaron P., Catala P., Parthuisot N., 1998.** Effectiveness of SYTOX Green Satin for Bacterial Viability Assessment. Applied and Environmental Microbiology. 64: 2697-2700.
- **Li A., Lee P.Y., Ho B., Ding J.L., Lim C.T., 2006.** Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta. 1768: 411-418.
- **López-Amorós R., Comas R., Vives-Rego J., 1995.** Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. Applied and Environmental Microbiology. 61: 2521-2526.
- **Madigan M.T., Martinko J.M, Parker J., 2004.** Brock. Biología de los Microorganismos. Capítulos 1, 12. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid.
- **Malfatti F., Azam F., 2009.** Atomic Force Microscopy reveals microscale networks and possible symbioses among pelagic marine bacteria. Aquatic Microbial Ecology. 58: 1-14.
- **Manz W., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H, 1992.** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. Systematic and Applied Microbiology. 15: 593-600.
- **Manz W., Wagner M., Amann R., Schleifer K.H., 1994.** *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. Water Research. 28: 1715-1723.
- **Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K.H., 1996.** Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiology. 142: 1097-1106.
- **Mason D.J., López-Amorós R., Allman R., Stark J.M., Lloyd D., 1995.** The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. Journal of Bacteriology. 78: 309-315.

- **National Academy of Sciences. 1969.** Eutrophication: causes, consequences, correctives. NAS. Washington. D.C.
- **Neef A., 1997.** Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doctoral thesis (Technische Universität München).
- **Neish A.S., 2009.** Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*. 136: 65-80.
- **Noble R.T., Fuhrman J.A., 1999.** Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products. *Aquatic Microbial Ecology*. 20: 1-11.
- **Nold S.C., Zwart G., 1998.** Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. *Aquatic Ecology*. 35: 17-35.
- **Ootsubo M., Shimizu T., Tanaka R., Sawabe T., Tajima K., Yoshimizu M., Ezura Y., Ezaki T., and Oyaizu H., 2002.** Oligonucleotide probe for detecting Enterobacteriaceae by in situ hybridization. *Journal and Applied Microbiology*. 93: 60-68.
- **Pedros-Alio C., Brock TD., 1983.** The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud*. 98: 354-379.
- **Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., 2002.** Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3094-3101.
- **Pernthaler J., Pernthaler A., Amann R., 2003.** Automated Enumeration of Groups of Marine Picoplankton after Fluorescence *in situ* Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2631-2637.
- **Pernthaler, 2005.** Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 1-9.
- **Phe M. H., Dossot M., Guilloteau H., Block J.C., 2005.** Nucleic acid fluorochromes and flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria. *Water Research*. 39: 3618–3628.
- **Pomeroy L.R., Williams P.J. leB., Azam F., Hobbie J.E., 2007.** The microbial loop. *Oceanography*. 20: 28-33.
- **Porter K., Feig Y., 1980.** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnological Oceanography*. 25: 943-948.
- **Porter J., Diaper J., Edwards C., Pickup R., 1995.** Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2783-2786.
- **Porter J., Deere D., Pickup R., Edwards C., 1996.** Fluorescent probes and flow cytometry, a comparison with classical methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 7948-7954.

- **Pradeep A S., Sime-Ngando T., 2008.** Functional responses of prokaryotes and viruses to grazer effects and nutrient additions in freshwater microcosms. *The Isme Journal*. 2: 498-509.
- **Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994.** Capítulo 25. Agua y bebidas sin alcohol. Sección 1. Agua. 25.1.1 y 25.1.4. 304-A y 305-A.
- **Roller C.,** Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H., 1994. In situ probing of Gram positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-target oligonucleotides. *Microbiology*. 140: 2849-2858.
- **Safak L., Hatice E., Noguera D., 2006.** Making all parts of the ARNr 16S of *Escherichia coli* Accesible In Situ to single DNA Oligonucleotides. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 733-744.
- **Savichtcheva O., Okabe S., 2006.** Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water research*. 40: 2463-2476.
- **Schäfer H., Servais P., Muyzer G., 2000.** Sucessional changes in the diversity of a marine assemblage during confinement. *Archives of Microbiology*. 173: 138-145.
- **Schäfer H., Bernard L., Courties C., Lebaron P., Servais P., Pukall R., Stackerbrandt E., Troussellier M., Guindulain T., Vives-Rego J., Muyzer G., 2001.** Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater. *FEMS. Microbiolial Ecology*. 34: 243-253.
- **Sheldon R.W., Prakash A., Sutcliffe W.H., 1972.** The size distribution of particles in the ocean. *Limnology Oceanography*. 17: 327-340.
- **Sherr E.B., Sherr B.F., 2002.** Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 293-308.
- **Shi L., Günther S., Hübschmann T., Wick L., Harms H., Müller S., 2007.** Limitis of Propidium Iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A*. 715: 592-598.
- **Schraft H., Watterworth L.A., 2005.** Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparision of 3M™ Petrifilm™ plates with standard plating procedures. *Journal of Microbiological Methods* 60: 335-342.
- **SNAP, 2009.** Proyecto de ingreso del área protegida marino-costera de Cabo Polonio al Sistema Nacional de Áreas Protegidas.
- **Stackebrandt E., Murray R.G.E., Trüper H.G., 1988.** *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38: 321-325.
- **Stetler R.E., 1984.** Coliphages as Indicators of Enteroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:668-670.

- **Stoecker K., Dorninger C., Daims H., Wagner M., 2010.** Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 922-926.
- **Suzuki M.T., 1999.** Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology*. 20: 261-272.
- **Teira E., Reinthaler T., Pernthaler A., Pernthaler J., Herndl G.J., 2004.** Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization and Microautoradiography To Detect Substrate Utilization by Bacteria and Archaea in the Deep Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4411-4414.
- **Teira E., Martínez-García S., Carreira C., Morán X-A.G., 2011.** Changes in bacterioplankton and phytoplankton community composition in response to nutrient additions in coastal waters off the NW Iberian Peninsula. *Marine Ecology Progress Series*. 426: 87-104.
- **Tranvik L.J., 1992.** Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiologia*. 229- 107-114.
- **Turner K., Porter J., Pickup R., Edwards C., 2000.** Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of *Salmonella typhimurium* measured by flow cytometry. *Journal and Applied Microbiology*. 89: 90-99.
- **Unanue M., Ayo B., Azua I., Barcina I., Iriberry J., 1992.** Temporal variability of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Microbial Ecology*. 23: 27-39.
- **Weinbauer M.G., Höfle M.G; 1998.** Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 431-438.
- **Weinbauer M.G., Rassoulzadegan F., 2004.** Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*. 6: 1-11.
- **Wetzel R.G., 1992.** Gradient-dominated ecosystems: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia*. 229: 181-198.
- **WHO, 1993.** WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. Vol 1. Recommendations, 2nd Edition. Geneva: World Health Organization.
- **Williams S.C., Hong Y., Danavall D.C.A., Howard-Jones M.H., Gibson D., Frischer M.E., Verita P.G., 1998.** Distinguishing between living and non living bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods*. 32: 225-236.
- **Williams C.J., Lavrentyev P.J., Jochem F.J., 2008.** Bottom-up and top-down control of heterotrophic bacterioplankton growth in a phosphorus-depleted subtropical estuary, Florida Bay, USA. *Marine Ecology Progress Series*. 372: 7-18.

- **Woese C., Kandler O., Wheelis M.L., 1990.** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 87: 576-4579.
- **Zoppini A., Amalfitano S., 2011.** Detection and dynamics of fecal indicator bacteria in two Tyrrhenian lagoons (Sabaudia and Orbetello, central Italy). Transitional Waters Bulletin. 5: 8-22.

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

---

	<b><i>Página</i></b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de la trama trófica acuática, con énfasis en el bucle microbiano .....	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático de un microscopio de fuerza atómica .....	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> Ubicación de Cabo Polonio, departamento de Rocha .....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Fotos de cachimbas en Cabo Polonio.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Fotos de cachimbas y pozos sépticos localizados a pocos metros de distancia unos de otros, en las construcciones del Cabo Polonio .....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema del diseño experimental .....	<b>25</b>
<b>Figura 7.</b> A) Abundancia de bacterias totales B) Abundancia de <i>E. coli</i> inoculada en ambos tratamientos del experimento .....	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> Fotografías obtenidas por microscopia de epifluorescencia de bacterias hibridadas con la sonda EnterbactB en el tratamiento estático .....	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Fotografías obtenidas por microscopia de epifluorescencia de bacterias hibridadas con la sonda EnterbactB en el tratamiento remoción .....	<b>31</b>

<b>Figura 10.</b> Contenido de materia orgánica y sólidos en suspensión .....	<b>32</b>
<b>Figura 11.</b> Abundancia de la población de <i>E. coli</i> indicadora y de bacterias viables calculadas a partir de la tinción con IP.....	<b>33</b>
<b>Figura 12.</b> Abundancia bacteriana total y de bacterias no viables en A) tratamiento estático B) tratamiento remoción.....	<b>33</b>
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de bacterias viables respecto al total para los dos tratamientos del experimento .....	<b>33</b>
<b>Figura 14.</b> Abundancia de las subclases de Proteobacteria (A, B y C.1), de los filos Actinobacteria (D) y Bacteroidetes (E) para los dos tratamientos del experimento .....	<b>36</b>
<b>Figura 15.</b> Imágenes de microscopía de fuerza atómica .....	<b>37</b>
<b>Tabla 1.</b> Sondas empleadas para la determinación por CARD-FISH.....	<b>28</b>