

BACTERIAS PATOGENAS EN SEDIMENTOS DE LA BAHIA DE TODOS SANTOS, BAJA CALIFORNIA

BACTERIAL PATHOGENS IN SEDIMENTS OF BAHIA DE TODOS SANTOS, BAJA CALIFORNIA

Francisco Delgadillo Hinojosa
María Victoria Orozco Borbón
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Apartado Postal 453
Ensenada, Baja California, México

Delgadillo-Hinojosa, F. y Orozco Borbón, M.V.-Bacterias patógenas en sedimentos de la Bahía de Todos Santos, Baja California. *Bacterial Pathogens in Sediments of Bahía de Todos Santos, Baja California*. *Ciencias Marinas*, 13(3): 31-38, 1987.

RESUMEN

Durante 1983, se investigó el contenido de bacterias patógenas en los sedimentos superficiales de la Bahía de Todos Santos, Baja California. Los porcentajes de aislamiento confirman la validez de utilizar a las bacterias del grupo coliforme como indicadoras de contaminación microbiana. Los géneros distribuidos más ampliamente en los sedimentos fueron *Escherichia* sp., *Alcaligenes* sp. y *Klebsiella* sp. mientras que *Shigella* sp. y *Salmonella* sp. se localizaron sólo cerca de los efluentes. En los sedimentos de la bahía se detectaron *Shigella sonnei* y *Salmonella choleraesuis*, incluso en áreas de uso recreativo. Estas bacterias se han asociado con epidemias en otras partes del mundo.

ABSTRACT

During 1983, the bacteriological content of the surface sediments was studied in the Bahía de Todos Santos, Baja California. The isolation percentages confirm the validity of using the bacteria of the coliform group as indicators of microbial pollution. The most abundant genus in the sediments were *Escherichia* sp. *Alcaligenes* sp. y *Klebsiella* sp., whereas *Shigella* sp. and *Salmonella* sp. were located only near the effluents. In the sediments of the bay, *Shigella sonnei* and *Salmonella choleraesuis* were detected, even in recreational areas. These bacteria have been associated with epidemics in other parts of the world.

INTRODUCCION

Las aguas residuales vertidas al mar contienen gran cantidad de microorganismos de los cuales algunos son patógenos, entre los que se puede mencionar a los Estreptococos, Estafilococos, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, virus de la hepatitis y de la poliomiélitis. Estos microorganismos al penetrar al medio marino son afectados por factores adversos para su desarrollo y sobrevivencia, como son: efecto bactericida del agua de mar, luz solar y sedimentación (Mitchell, 1968; Morris y Kim, 1976; Ramia, 1985). Sin embargo, logran

INTRODUCTION

The wastewaters that flow into the sea contain many microorganisms, some of which are pathogenous, such as the *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, virus of hepatitis and poliomyelitis. When they penetrate the marine medium, those microorganisms are affected by several adverse factors that threaten their development and survival, that is the bactericidal effects of seawater, sun light and sedimentation (Mitchell, 1968; Morris and Kim, 1976; Ramia, 1985). Nevertheless, they are able to survive in sufficient concen-

sobrevivir en concentración suficiente ocasionando enfermedades, principalmente a bañistas, como tifoidea, paratifoidea, gastroenteritis, hepatitis y poliomyelitis (Seyfried *et al.*, 1985; Favero, 1985; Ramia, 1985).

Tradicionalmente se realizan estudios bacteriológicos en sistemas acuáticos, no obstante se han incrementado las investigaciones de bacterias en sedimentos (Matson, 1978); mostrándose mayores concentraciones de bacterias en sedimentos que en aguas superficiales. Estos microorganismos, por acción del oleaje y las corrientes, son resuspendidos a la columna de agua, aumentando de manera considerable la densidad de bacteria en áreas de uso recreativo (Van Donsel y Geldreich, 1971; Gerba *et al.*, 1977; Seyfried *et al.*, 1985).

El Puerto de Ensenada, BC., en la Bahía de Todos Santos es el principal centro pesquero de la región Noroccidental del país. Su costa recibe descargas de fábricas procesadoras de pescado, además de las aguas negras de la ciudad (Sañudo Wilhelmy *et al.*, 1984). Al agua costera también se le da uso en la industria pesquera como vehículo de conducción, limpieza y descongelamiento de materia prima. Sin embargo, las playas son utilizadas por el turismo y la población, pudiendo constituir un problema de higiene y de salud pública.

Con base en lo anteriormente descrito y en falta de estudios al respecto el objetivo del presente trabajo es el de caracterizar el contenido bacteriano de los sedimentos superficiales de la Bahía de Todos Santos, BC.

MATERIALES Y METODOS

La posición de las estaciones de muestreo (Fig. 1) fue determinada de acuerdo a:

i) Localización geográfica de las descargas de aguas residuales a la Bahía de Todos Santos.

ii) Al patrón de circulación costera de las aguas de la bahía propuesto por Chee-Barragán, y Pérez-Higuera, (1982).

tration and cause illnesses, mainly to swimmers, such as typhoid and paratyphoid fever, gastroenteritis, hepatitis and poliomyelitis (Seyfried *et al.*, 1985; Favero, 1985, Ramia, 1985).

Traditionally, bacteriological studies have been carried out in aquatic systems. However, research on bacteria in sediments has increased (Matson, 1978), showing higher concentrations of bacteria in sediments than in surface waters. Due to wave and current actions, these microorganisms are resuspended in the water column and the density of bacteria increases considerably in recreational areas (Van Donsel and Geldreich, 1971; Gerba *et al.*, 1977; Seyfried *et al.*, 1985).

Puerto de Ensenada, BC, in the Bahía Todos Santos is the main fishing center in the northwestern part of the country. Its coast receives residues from fish processing factories as well as the wastewaters from the city (Sañudo Wilhelmy *et al.*, 1984). Coastal water is used in the fishing industry as a conduction material, as a cleaning agent and as a defrosting element of raw material. Yet, as the beaches are used by tourists and by the local population, this might cause a public health problem.

Due to these reasons and to the lack of studies, the objective of the present paper is to characterize the bacteriological content of the surface sediments in the Bahía de Todos Santos, BC.

MATERIAL AND METHODS

The position of the sampling stations (Fig.1) has been determined according to:

i) the geographical locations of the residues thrown into the Bahía de Todos Santos.

ii) the coastal circulation pattern of the waters of the bay proposed by Chee-Barragán and Pérez-Higuera (1982).

1) Sampling method

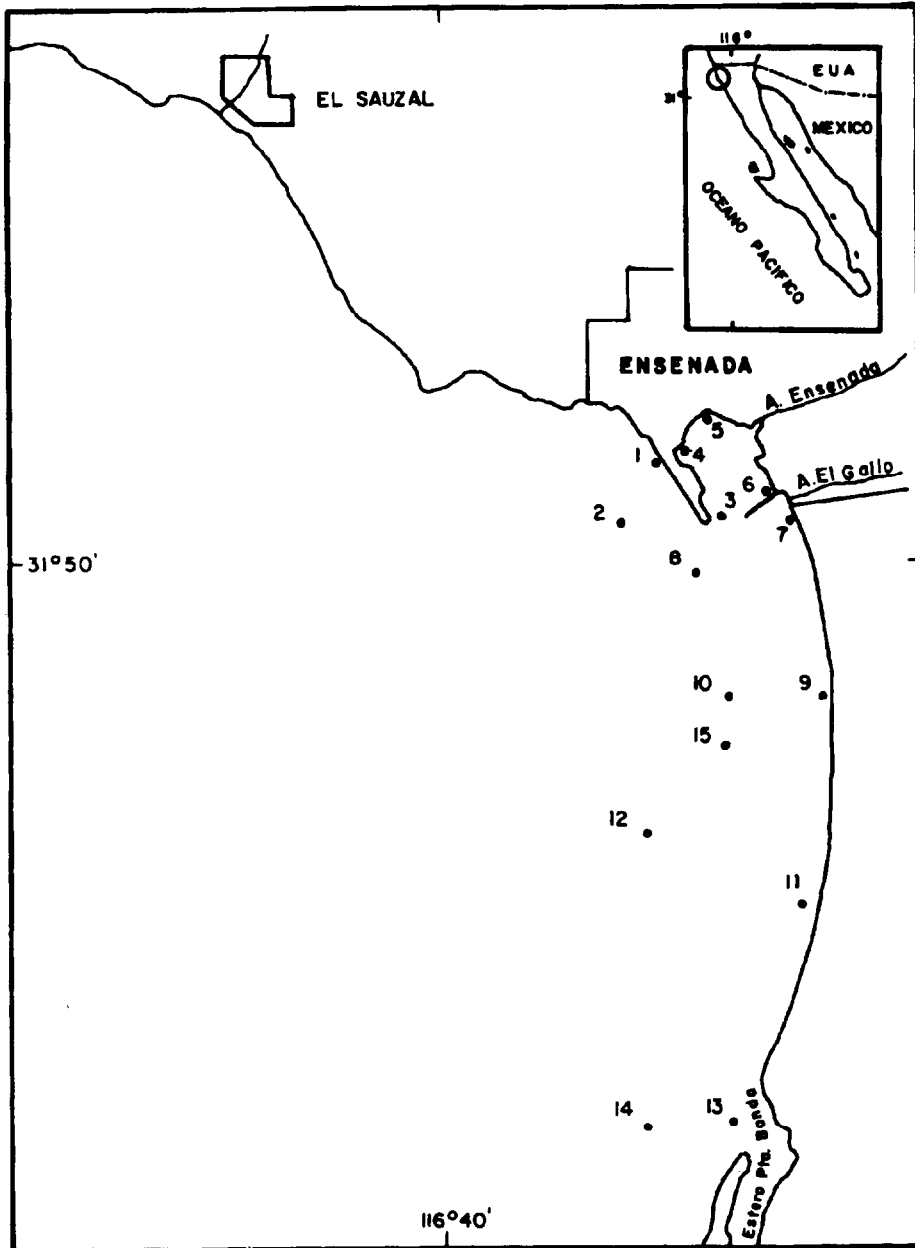


Figura 1. Localización del área de estudio y estaciones de muestreo.
Figure 1. Localization of the study area and sampling stations.

1) Método de muestreo

Durante los meses de junio, septiembre y noviembre de 1983, se colectaron un total de 42 muestras de sedimentos en 15 estaciones. Se utilizó la metodología de muestreo de sedimentos (Gaughan, 1981) con una draga Dietz-Lafont la cual cubre un área de .01m². El primer centímetro de la superficie fue removida con una espátula y colocada en frascos estériles calibrados a 100ml y conteniendo 50ml de agua de dilución. Las muestras fueron refrigeradas a 4°C y transportadas al laboratorio para el análisis inmediato (período no mayor de 24 horas).

2) Método de análisis de bacterias

El aislamiento de bacterias patógenas se determinó de acuerdo a Difco (1978). Para mejorar la detección de *Salmonella* sp., se añadieron 3ml de muestra a 10ml del medio de enriquecimiento selenito, incubándose a 37°C.

El esparcido en placa, para la caracterización de bacterias en general, fue hecho después de 18-24 horas en los medios primarios agar verde brillante, agar sulfito bismuto, agar ss y agar de MacConkey. El medio de purificación utilizado fue el agar de MacConkey a las 24 horas. Las colonias aisladas fueron inoculadas en agar con triple azúcar y hierro, medio sim, citrato de simmons y caldo con urea.

Los cultivos que mostraron crecimiento en agar con triple azúcar y hierro fueron probados para fermentación en xilosa, dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa, ramosa, manitol, dulcitol y salicina.

Se realizaron determinaciones de bacterias coliformes totales, coliformes fecales y *Streptococos* fecales de las mismas muestras (Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa, sin publicarse).

RESULTADOS Y DISCUSION

El por ciento de aislamiento de bacterias en sedimentos se presentan en la Tabla I. El género *Escherichia* sp. se aisló más abundantemente, encontrándose siempre en propor-

During June, September and November 1983, as much as 42 samples of sediments were collected in 15 stations. The sediment sampling methodology (Gaughan, 1981) was used with a Dietz-Lafont dredge which covers an area of 0.01m². The first centimeter of the surface was removed with a spatula and put into sterile flasks, calibrated to 100ml and containing 50ml of dilution water. The samples were refrigerated at 4°C and transported to the laboratory for their immediate analysis (no more than 24 hour period).

2) Bacteria analysis method

The isolation of bacterial pathogens was determined according to Difco (1978). To improve the *Salmonella* sp. detection, 3ml of sample was added to 10ml of the medium of selenite enrichment, incubating at 37°C.

The spreading on plates for the characterization of bacteria in general was done after 18-24 hours in primary medium brilliant green agar, bismuth sulfite agar, ss agar and MacConkey agar. The purification medium used was MacConkey agar after 24 hours. The isolated colonies were inoculated in triple sugar iron agar, SIM medium, Simmons citrate and urea broth.

The cultures that presented growth in triple sugar iron agar were tried for fermentation in xylose, dextrose, maltose, sucrose, lactose, rhamnose, mannitol, dulcitol and salicin.

Determinations of total coliform bacteria, fecal coliforms and fecal streptococcus were made in the same samples (Orozco-Borbón and Delgadillo Hinojosa, unpublished data).

RESULTS AND DISCUSSION

The percentage of bacteria isolated in sediments are presented in Table I. The genus *Escherichia* sp. was isolated more abundantly and was always found in higher proportions than the bacterial pathogens. This confirms the validity of using the coliform bacteria group as indicators of bacterial pollution.

ciones más altas que las bacterias patógenas. Esto confirma la validez de utilizar a las bacterias del grupo coliforme como indicadores de contaminación bacteriana.

Las bacterias aisladas en los sedimentos se muestran en la Tabla II, observándose que las estaciones más próximas a las descargas (E1, E7, E9) presentan mayor diversidad de especies. Esto es producto de la cantidad y riqueza de especies que poseen las aguas de desecho doméstico.

Geográficamente las bacterias distribuidas más ampliamente en los sedimentos fueron los géneros *Escherichia* sp., *Alcaligenes* sp. y *Klebsiella* sp. (Tabla II). Estas se encontraron casi en toda el área de estudio, mientras que las bacterias patógenas como *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. se localizaron solo en las estaciones cercanas a los efluentes. Esto se explica por la mayor sobrevivencia de estas bacterias con relación a las patógenas (Scarpino, 1971).

Los resultados muestran que en las estaciones donde se aisló *Salmonella* sp. siempre hubo una concentración mayor de 1000 coliformes/100g de sedimento (Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa, sin publicarse). Grunnet (1978) señala que en concentraciones mayores de 1 000 coliformes fecales hay un 50% de probabilidades de encontrar *Salmonella* sp. Sin embargo, no existe hasta la fecha una relación definida de coliformes fecales y salmonella. Goyal (1977) encontró que la razón salmonella coliformes fecales variaba de 1:9 hasta 1:2000 en sedimentos. Esto se debe a que la ocurrencia y sobrevivencia de ambos en aguas y sedimentos es variable, aunado a los cambios que sufre la población infectada por *Salmonella* en el área y que descarga sus heces al medio marino.

En el presente estudio *Salmonella* sp. puede ser utilizado como trazador de la contaminación microbiana. Esta proviene de la llamada descarga de Pesquera Peninsular y del Arroyo El Gallo, son transportadas hacia el interior de la rada, el centro y sur de la bahía. Este patrón de dispersión es similar al propuesto por Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa (sin publicarse).

Tabla I. Porcentaje de aislamiento de bacterias detectadas en los sedimentos de Bahía de Todos Santos, durante 1983.

Table I. Percentage of isolation of bacteria detected in the sediments of Bahía de Todos Santos, during 1983.

GENERO	JUNIO	SEPT.	NOV.
<i>Escherichia</i> sp.	50.0	34.42	33.92
<i>Proteus</i> sp.	7.14	14.75	1.78
<i>Salmonells</i> sp.	7.14	8.19	-
<i>Shigella</i> sp.	7.14	-	21.42
<i>Enterobacter</i> sp.	-	16.39	12.50
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	14.75	-
<i>Klebsiella</i> sp.	25.0	6.55	12.50
<i>Alcaligenes</i> sp.	3.57	4.91	17.85

The isolated bacteria in the sediments are shown on Table II and it appears that the stations closest to the discharges (E1, E7, E9) present a greater diversity of species. This is due to the quantity and variety of the species that exist in domestic wastewaters.

Geographically, the most distributed bacteria in the sediments were the genus *Escherichia* sp., *Alcaligenes* sp. and *Klebsiella* sp. (Table II). The latter were found almost in the whole study area. The bacterial pathogens, however, such as *Salmonella* sp. and *Shigella* sp. were detected only in the stations near the effluents. This is explained by the higher survival of these bacteria in relation with that of the pathogens (Scarpino, 1971).

The results show that the stations where *Salmonella* sp. were isolated, there was always a higher concentration of 1000 coliforms/100g of sediments (Orozco-Borbón and Delgadillo-Hinojosa, unpublished data). Grunnet (1978) points out that in concentrations higher than 1 000 fecal coliforms, there are 50% of probabilities of finding *Salmonella* sp. Yet, up to now, there is no definite relationship of fecal coliforms and *Salmonella*. Goyal (1977) found that the ratio *Salmonella* fecal coliforms varied from 1:9 to 1:2000 in sediments. This is due to the fact that the occurrence and survival of both in water and

Tabla II. Bacteria aisladas en los sedimentos de la Bahía de Todos Santos, BC., durante 1983.

Table II. Isolated bacteria in the sediments of Bahía de Todos Santos, BC, during 1983.

ORGANISMO AISLADO	ESTACION														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Shigella dysenteriae</i>					X										
<i>Shigella sonnei</i>	X									X					
<i>Shigella paradysenteriae</i>	X														
<i>Shigella alkalescens</i>									X						
<i>Shigella madampensis</i>	X							X							
<i>Shigella ceylonensis</i>								X							
<i>Shigella sp.</i>	X	X								X					
<i>Salmonella thyposa</i>	X														
<i>Salmonella choleraesuis</i>			X				X	X							
<i>Salmonella sp.</i>							X	X							
<i>Enterobacter aerogenes</i>	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X		X
<i>Escherichia coli</i>			X	X			X	X	X	X					X
<i>E. freundii</i>	X	X	X		X	X	X	X	X	X			X		
<i>E. intermedium</i>	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X	X	X
<i>Proteus vulgaris</i>					X				X	X					
<i>Proteus mirabilis</i>	X			X		X									
<i>Proteus morgani</i>						X									
<i>Proteus sp.</i>		X							X						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		X	X	X	X		X	X			X	X	X		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			X				X	X	X						
<i>Alcaligenes faecalis</i>		X	X	X			X	X	X	X		X		X	X

En las estaciones E1, E7 y E9 se aislaron en la misma muestra las bacterias *Salmonella choleraesuis* y *Escherichia coli*. Goyal *et al.* (1979) reportan que las coliformes fecales aisladas del sedimento son capaces de transferir parte o toda su resistencia a los anti-bióticos a *E. coli* y *S. choleraesuis*. Esto constituye un peligro potencial para futuros tratamientos dados a pacientes infectados por este tipo de bacterias.

En general *Shigella sp.* se aisló en estaciones con altas y bajas concentraciones de bacterias coliformes. En la estación 5 se aisló *Shigella paradysenteriae*, sin embargo, no fueron detectados coliformes fecales (<2 coliformes/100g de sedimento). Reasoner (1978) indica que el aislamiento de *Shigella* en agua no es frecuente y generalmente se detecta

sediments is variable, besides the changes that affect the population infected by *Salmonella* in the area and that expulse their faeces into the marine medium.

In the present study, *Salmonella sp.* may be used as a tracer of the microbial pollution. These microbes come from the so-called Pesquera Peninsular outfall and from the Arroyo El Gallo and are transported towards the interior of the harbor as well to the center and the south of the bay. This dispersion pattern is similar to the one proposed by Orozco-Borbón and Delgadillo Hinojosa (unpublished data).

In the stations E1, E7 and E9, the bacteria *Salmonella choleraesuis* and *Escherichia coli* were isolated in the same

cuando existe gran contaminación fecal. Rosenberget *al.* (1976) reportan el aislamiento de *Shigella sonnei* en aguas del río Mississippi después de una epidemia de Shigellosis entre nadadores. Este estudio muestra que en sedimentos de la Bahía de Todos Santos (E1 y E10) se aisló *Shigella sonnei*.

La detección de bacterias patógenas como *Salmonella choleraesuis* y *Shigella sonnei*, incluso en áreas de uso recreativo, refleja que la contaminación microbiana en la bahía es significativa.

Las legislaciones ambientales de México y otros países no contemplan estándares establecidos para bacterias indicadoras y patógenas en sedimentos. Sin embargo, deben considerarse como un riesgo potencial a la salud pública, ya que la interfase sedimento-agua no es un sistema estático y, las bacterias presentes pueden ser liberadas al agua adyacente por efecto de mareas y corrientes y ser transportadas a zonas de uso recreativo y/o cultivo. Actualmente estas actividades se están desarrollando en la Bahía de Todos Santos.

LITERATURA CITADA

Chee-Barragán, A. y Pérez Higuera, R. (1982) Patrón de circulación a partir de algunas características naturales de los sedimentos en la Bahía de Todos Santos IIO - UABC Reporte Anual. Ensenada, BC., México: 48pp.

DIFCO., (1978) Manual de Bacteriología. DIFCO Laboratories Inc. Valdemoro Madrid, España: 395pp.

Favero, M.S., (1985) Microbiologic Indicators of Health Risks Associated with Swimming. Amer. J. of Public Health. 75(9):1051-1054.

Gaughan, P. (1981) Metodología de muestreo de sedimentos para la obtención de datos químicos y biológicos con relación a la contaminación marina. CICESE. Informe Técnico. OC-81-02: 28pp.

Gerba, C.P., Goyal, S.M., Smith, E.M. and Melnick, J.L. (1977) Distribution of Viral and Bacterial Pathogens in a Coastal Canal Community. Mar. Pollut. Bull. 8(12): 279-281.

sample. Goyal *et al.* (1979) report that the fecal coliforms isolated from the sediment are able to transfer part or all their resistance to antibiotics to *E. Coli* and *S. Choleraesuis*. This represents a potential hazard for future treatments given to patients infected by this type of bacteria.

In general, *Shigella* sp. was isolated in stations with high and low concentrations of coliform bacteria. In station 5, *Shigella paradysenteriae* was isolated, however fecal coliforms (<2 coliforms/100g of sediment) were not detected. Reasoner (1978) states that the *Shigella* isolation in water is not frequent and it is generally detected when there is a high degree of fecal pollution. Rosenberg *et al.* (1976) report the *Shigella sonnei* isolation in the waters of the Mississippi river after a Shigellosis epidemic among swimmers. This study shows that in sediments of Bahía de Todos Santos (E1 and E10) *Shigella sonnei* was isolated.

The detection of bacterial pathogens such as *Salmonella choleraesuis* and *Shigella sonnei*, even in recreational areas, shows that the microbial pollution in the Bay is significant.

The environmental legislations in Mexico and other countries do not contemplate standards established for bacterial indicators and pathogens in sediments. However, they must be considered potentially hazardous for public health, since the sediment-water interphase is not a static system and the present bacteria may be liberated into the adjacent water due to tides and currents and be transported to recreational and/or aquacultural areas. At present, these activities actually take place in the Bahía de Todos Santos.

Katarzyna Michejda translated this paper into English.

Goyal, S.M. (1977) Occurrence and Distribution of Bacterial Indicators and Pathogens in Canal Communities along the Texas Coast. Appl. Environ. Microbiol. 34: 139.

Goyal, S.M. Gerba, C.P. and Melnik, J.L. (1979) R⁺ Bacteria in Estuarine Sediments. Mar. Pollut. Bull. 10(1): 25-27.

Grunnet, K., (1978) Selected Microorganisms for Coastal Pollution Studies and Coastal Pollution Control. (3): 759-775.

Matson, E.A., Hornor, S.G. and Buck, J.D. (1978) Pollution Indicators and Other Microorganisms in River Sediments. J. Wat. Pollut. Control Fed.

Mitchel, R. (1968) Factors Affecting the Decline of non Marine Microorganisms in Sea Water. Water Res. 2: 635-642.

Morris, R.L. and Kim, J. (1976). Viruses and Bacteria in Coastal Water and Shellfish. South. Calif. Coastal Water Res. Proj. Annual Report. 97-103.

Orozco-Borbón, M.V. y Delgadillo-Hinojosa, F. (sin publicarse) Contaminación fecal en sedimentos superficiales de la Bahía de Todos Santos, Baja California. Ciencias Marinas (en prensa).

Reasoner, D.J. (1978) Microbiology: Detection of Bacterial pathogens and their Occurrence. J. Wat. Pollut. Control Fed. 50: 1382-1395.

Ramia, S. (1985) Transmission of Viral Infections by the Water Route: Implications for Developing Countries. Reviews of Infectious Diseases. 7(2): 180-188.

Rosenberg, M.L., Azlet, K.K., Schaefer, S., Wells, J.G. and Pruneda, R.C. (1976) Shigellosis from Swimming. J. Amer. Med. Assoc. 236: 1849-1852.

Sañudo-Wilhelmy, S.A., Morales, A. y Vargas, J.A. (1984) Contaminación fecal en la Bahía de Ensenada, BC., México. Ciencias Marinas 10(1): 7-17.

Scarpino, P.V. (1971) Bacterial and Viral Analysis of Water and Wastewater. In: Wat. and Wat. Pollut. Handbook. Ciaccio Leonard (Ed). New York: 2: 639-751.

Seyfried, P.L., Richar, M.S., Tobin, S, Brown, N.E. and Ness, P.F. (1985) a prospective study of swimming related illness II. Morbidity and the microbiological quality of water. Amer. J. of Public Health. 75(9): 1071-1075.

Van Donsel, D.J. and Geldreich, E.E. (1971) Relationship of Salmonella to Fecal Coliforms in Bottom Sediments. Wat. Res. 5: 1079-1087.