

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Calidad microbiológica del agua del río Mero

Calidade microbiolóxica da auga do río Mero

Microbiological water quality of the river Mero

Eva Álvarez Vieites

Julio, 2017

Tutor Académico: Ángeles Cid Blanco

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
3. Material y métodos.....	5
3.1. Sitio de estudio y muestreo.....	5
3.2. pH.....	6
3.3. Análisis microbiológico.....	6
3.4. Crecimiento de <i>Chlamydomonas moewusii</i>	8
3.5. Análisis de clorofilas de <i>Chlamydomonas moewusii</i>	9
3.6. Tratamiento estadístico.....	9
4. Resultados y discusión.....	10
4.1. pH.....	10
4.2. Análisis microbiológico.....	10
4.2.1. Coliformes totales.....	10
4.2.2. Coliformes fecales.....	11
4.2.3. Enterococos.....	13
4.2.4. <i>Pseudomonas</i>	14
4.3. Crecimiento de <i>Chlamydomonas moewusii</i>	15
4.4. Análisis de clorofilas de <i>Chlamydomonas moewusii</i>	17
5. Conclusiones/Conclusións/Conclusions.....	18
6. Bibliografía.....	20

Resumen

Los ríos son la fuente de agua dulce más importante para los seres humanos, por lo que es necesario conocer su estado y evitar la contaminación asociada al rápido desarrollo de la población, que conlleva un continuo desgaste del medio natural. Por este motivo, se ha llevado a cabo un estudio sobre la calidad del agua del río Mero a partir de distintos puntos de su curso para conocer cómo las actividades humanas afectan a sus aguas.

Para ello se ha realizado un análisis microbiológico de coliformes totales, coliformes fecales, enterococos y *Pseudomonas*, encontrando un aumento progresivo de coliformes fecales desde el nacimiento del río hasta su desembocadura. También se ha realizado un estudio sobre el desarrollo de la microalga *Chlamydomonas moewusii*, utilizando el agua muestreada para preparar el medio de cultivo necesario.

Tras el análisis, se concluye que, aunque la calidad del agua es buena tanto para el desarrollo de las plantas como de los animales acuáticos asociados al río, el aumento de coliformes fecales en las zonas urbanas así como el aumento del crecimiento de *C. moewusii* en estos últimos puntos, evidencian una alta descarga de aguas residuales domésticas portadoras de materia orgánica y contaminación fecal, por lo que se hace necesario controlar los vertidos a las aguas naturales para evitar los problemas de salud que podrían provocar las bacterias asociadas a la presencia de contaminación fecal en las aguas.

Palabras clave: Mero, coliformes fecales, coliformes totales, *Pseudomonas*, enterococos, *Chlamydomonas moewusii*, crecimiento, clorofilas.

Resumo

Os ríos son a fonte de auga doce máis importante para os seres humanos, polo que é necesario coñecer o seu estado e evitar a contaminación asociada ó rápido desenvolvemento da poboación, que supón un continuo desgaste do medio natural. Por este motivo levouse a cabo un estudo sobre a calidade da auga do río Mero a partir de distintos puntos do seu curso para coñecer cómo as actividades humanas afectan as súas augas.

Para isto realizouse unha análise microbiolóxica de coliformes totales, coliformes fecais, enterococos e *Pseudomonas*, encontrando un aumento progresivo de coliformes fecais dende o nacemento do río ata a súa desembocadura. Realizouse tamén un estudo sobre o desenvolvemento da microalga *Chlamydomonas moewusii*, empregando a auga recollida para preparar o medio de cultivo necesario.

Tras a análise, conclúese que, aínda que a calidade da auga é boa tanto para o desenvolvemento das plantas como dos animais acuáticos asociados ó río, o aumento de coliformes fecais nas zonas urbanas así como o aumento do crecemento de *C. moewusii* nestes últimos puntos, evidencian una alta descarga de augas residuais domésticas portadoras de materia orgánica e contaminación fecal, polo que se fai necesario controlar os vertidos ás augas naturais para evitar os problemas de saúde que poderían provocar as bacterias asociadas á presenza de contaminación fecal nas augas.

Palabras chave: Mero, coliformes fecais, coliformes totales, *Pseudomonas*, enterococos, *Chlamydomonas moewusii*, crecemento, clorofilas.

Summary

Rivers are the most important source of fresh water for humans, so it's necessary to know their condition and avoid contamination associated with the fast increasment of the population, which entails a continuous wastage of the natural environment. For this reason, a study has been conducted on the water quality of the river Mero from different points of its course to know how human activities affect its waters.

Because of this, a microbiological analysis of total coliforms, faecal coliforms, enterococci and *Pseudomonas* has been carried out, finding a progressive increase of faecal coliforms from the source of the river to its mouth. Another study has been made on the microalgae *Chlamydomonas moewusii* growth, using the sampled water to prepare the necessary culture medium.

After the analysis, it is concluded that, although the water quality is good for the development of the plants and the aquatic animals associated to the river, the increase of faecal coliforms in urban areas as well as the growth of *C. moewusii* in the last points, evidences a high discharge of domestic wastewaters bearing organic matter and faecal contamination, reason why it is necessary to control the discharges to the natural waters to avoid the health problems that the bacteria associated to the presence of faecal contamination in the waters could provoke.

Keywords: Mero, faecal coliforms, total coliforms, *Pseudomonas*, enterococci, *Chlamydomonas moewusii*, growth, chlorophylls.

1. Introducción

El rápido y continuo progreso de la población humana conlleva el desarrollo de múltiples actividades que perjudican en mayor o menor medida al medio ambiente, dentro del cual la contaminación de las aguas superficiales es un problema de especial importancia en la sociedad.

Los ríos son el recurso de agua dulce más importante para los seres humanos. El desarrollo económico, social y político ha estado en el pasado, relacionado en gran medida con la disponibilidad y distribución de las aguas dulces contenidas en los sistemas fluviales (Chapman, 1992).

Se puede definir la polución del agua como una modificación, generalmente provocada por el hombre, de la calidad del agua, haciéndola impropia y peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca, las actividades recreativas, así como para los animales domésticos y la vida natural (Pérez & Espigares García, 1999).

Debido a la gran cantidad de actividades que se desarrollan en ellos, y a partir de ellos, es importante controlar su calidad para evitar los graves efectos negativos que se desprenderían de su contaminación. Esto es especialmente importante en los ríos que están situados en zonas de intensa actividad humana que conlleva la descarga de una gran cantidad de aguas residuales portadoras de contaminación a las aguas naturales.

En función de su origen podemos hablar de 3 fuentes principales de contaminación de las aguas: contaminación agrícola-ganadera, doméstica e industrial.

Las aguas residuales procedentes de origen agrícola-ganadero pueden aportar al agua grandes cantidades de estiércol y orines, es decir, mucha materia orgánica, nutrientes y microorganismos (Fundación MAPFRE, 1994). Por otro lado, las aguas residuales domésticas o aguas negras son aquellas que proceden de las heces y orina humanas, del aseo personal, cocina y de la limpieza de la casa y suelen contener gran cantidad de materia orgánica y microorganismos, así como restos de jabones, detergentes, lejía y grasas (Pérez & Espigares García, 1999). Además, físicamente, estas aguas, presentan color gris y diversas materias flotantes (Fundación MAPFRE, 1994).

Por último, los procesos industriales generan una gran variedad de aguas residuales, que pueden tener orígenes muy distintos, en función de los usos más frecuentes a los que se destine, de forma que pueden aparecer elementos propios de cada actividad industrial, entre los que cabe citar: tóxicos, iones metálicos, productos químicos, hidrocarburos, detergentes, pesticidas, etc. (Fundación MAPFRE, 1994).

Se ha observado que la contaminación microbiana está muy correlacionada con la densidad de población, la tasa de urbanización y el porcentaje de la industria terciaria en el producto interno bruto (Wang *et al.*, 2017) y que

además, una mayor proporción de áreas construidas y tierras cultivables resulta en un deterioro significativo de la calidad del agua (Lenart-boro, 2017).

Las masas receptoras, es decir, ríos y corrientes subterráneas, lagos, estuarios y el mar, especialmente en las zonas más densamente pobladas y desarrolladas, han sido incapaces, por sí mismas, de absorber y neutralizar la carga polucional que tales residuos imponen. De esta forma, han ido perdiendo sus condiciones naturales de apariencia física y su capacidad para sustentar una vida acuática adecuada, que responde al equilibrio ecológico que de ellas se espera para preservar nuestras masas hídricas (Pérez & Espigares García, 1999).

El agua, debido a su gran capacidad disolvente, se contamina por la mediación de los excrementos humanos o animales y de las aguas residuales. Esta contaminación fecal puede incorporar una variedad de diversos organismos patógenos, cuya presencia está relacionada con las enfermedades que puedan existir en ese momento en la comunidad. Otros organismos, cuya existencia en el ambiente es natural y a los que no se les considera patógenos, pueden producir en ocasiones infecciones de las denominadas de tipo oportunista, sobre todo en personas con una disminución de los mecanismos de defensa (Pérez & Espigares García, 1999). De esta forma, los problemas causados trascienden al campo de la sanidad, ya que las comunidades humanas necesitan recurrir a diversos recursos de agua superficiales para su abastecimiento de agua de bebida, y si éstos están contaminados con los productos de desecho humanos o industriales, pueden dar lugar a problemas epidemiológicos graves (Pérez & Espigares García, 1999).

Es importante tener en cuenta que, además de los efectos que el agua contaminada puede producir por su consumo directo, la presencia de contaminación también conllevaría a aquellos efectos que se originan indirectamente, como es el caso de la producción de alimentos con agua contaminada o la transmisión de enfermedades (Fundación MAPFRE, 1994).

La Comisión de Salud y Medio Ambiente de la OMS viene advirtiendo reiteradamente que tanto la salud y bienestar humanos, como la seguridad de los alimentos, el desarrollo industrial y los ecosistemas de los que aquellos dependen, se encuentran amenazados a menos que protejamos con más eficacia y sentido de la responsabilidad nuestros lagos y ríos, coordinando la gestión de los recursos terrestres e hídricos (Pérez & Espigares García, 1999).

Todos estos problemas hacen evidente la necesidad de controlar la calidad de las masas de agua dulce que se pueden ver afectadas por la acción humana. Este va a ser precisamente el objetivo de este estudio, para el cual se ha seleccionado como foco el río Mero, un río situado en la provincia de A Coruña (Galicia, España) y cuya relevancia se basa principalmente en dos factores:

- Por una parte, el río Mero pasa a lo largo de sus 41 Km de recorrido por zonas sometidas a los distintos tipos de alteraciones humanas descritas anteriormente, como son la actividad ganadera, actividades

recreativas e industriales, urbanización,...lo que nos permitirá observar cómo afectan todas estas condiciones a la calidad de su agua.

- En segundo lugar, este río destaca por su situación, ya que tiene una fuerte influencia sobre una importante y amplia zona urbana, lo que lo expone en mayor medida a la contaminación asociada al desarrollo de la población y a su consecuente contaminación del medio.

Por lo tanto, para llevar a cabo el siguiente estudio se ha realizado un control de los principales microorganismos indicadores de contaminación, así como un seguimiento del crecimiento de la microalga *C.moewusii* como representante de los organismos fotosintéticos base de la cadena trófica de las comunidades acuáticas, lo que permite conocer el estado de la calidad del agua tanto para los seres humanos como para el desarrollo de las comunidades biológicas asociadas al río.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio es conocer y comparar el estado del agua del río Mero desde su nacimiento hasta su desembocadura mediante la comparación de la calidad de sus aguas en distintos puntos a lo largo de su trayecto, para así conocer, no solo los efectos que tienen las actividades humanas sobre su estado, sino también los efectos que podrían tener estas aguas sobre la salud humana y el desarrollo de los animales y las plantas del medio.

Para ello se analiza la presencia de bacterias bioindicadoras de la calidad microbiológica del agua y se comprueba la capacidad de dicha agua para soportar el crecimiento de un organismo fotosintético sensible a numerosos contaminantes.

3. Material y métodos

3.1. Sitio de estudio y muestreo

Las muestras de agua fueron recogidas en 5 puntos a lo largo del curso del río Mero, el cuál nace en Montes da Tieira y sigue un recorrido de 41 km hasta desembocar en la ría del Burgo.

Los cinco puntos de muestreo, mostrados en la Fig.1, nos permitirán estudiar el posible impacto agrícola, industrial y urbano que sufre este río, así como comparar el estado de la corriente de agua desde su nacimiento hasta su desembocadura.

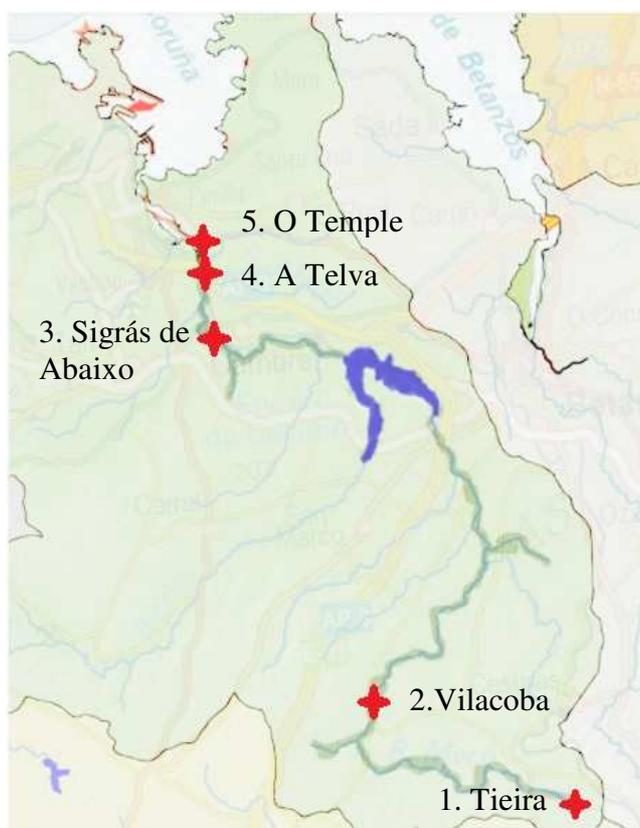


Figura 1. Trayecto del río Mero y localización de los puntos de muestreo.
(Mapa tomado de aguas de Galicia, Xunta de Galicia)

El primer punto de muestreo se sitúa en Tieira ($43^{\circ}08'14.4''N$, $8^{\circ}10'38.7''W$) localizada en el ayuntamiento de Mesía y se corresponde con el nacimiento del río, por lo que este punto será tomado como punto de control para estudiar las distintas variaciones que sufre a lo largo de su curso.

El segundo punto de muestreo es tomado en Vilacoba ($43^{\circ}10'14.7''N$, $8^{\circ}17'13.4''W$), población situada en el ayuntamiento de Abegondo, que destaca por la presencia de una intensa actividad agrícola y pesquera.

Los tres últimos puntos están localizados en el ayuntamiento de Cambre. El tercer (43°17'22.9"N, 8°21'10.2"W), y cuarto punto (43°18'26.7"N, 8°21'24.1"W) están situados en Sigrás de Abaixo y A Telva respectivamente y están incluidos en el paseo fluvial del río Mero, que alberga gran cantidad de actividades recreativas llevadas a cabo en sus orillas. Además, ambas zonas están situadas en una zona de intenso carácter urbano.

El quinto y último punto de muestreo (43°18'39.8"N, 8°21'21.1"W) se localiza en O Temple y está situado al final del curso del río, en la entrada de la ría del Burgo, siendo una zona de transición río-ría correspondiente a una zona urbana de tradición industrial.

Debido a las intensas actividades humanas presentes en los tres últimos puntos, estos puntos se convierten en lugares muy expuestos a alteraciones humanas y por lo tanto su estudio es de clara importancia para conocer no sólo como afectan las actividades humanas a la calidad del agua de dicho río, sino también la forma en la que el estado del agua puede afectar a los seres humanos y a la vida acuática del lugar.

Las muestras de agua de los distintos puntos son tomadas el mismo día para evitar así posibles variaciones derivadas de cambios climáticos o cambios en el caudal del río que puedan afectar a los resultados del estudio. En todos los puntos el volumen de agua tomada es de 500 ml.

3.2. pH

El pH es una variable importante en la calidad del agua que influye en muchos procesos biológicos y químicos dentro del río (Chapman, 1992). Además, el pH afecta a la actividad de las enzimas microbiológicas y a la actividad de los productos químicos, y por lo tanto juega un papel importante en el transporte de nutrientes y productos químicos tóxicos en las células (Bitton, 1994).

Por otra parte, el pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal, de forma que el pH del medio determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de Carbono (CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃²⁻), e influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Abalde *et al.*, 1995).

De esta forma, el pH juega un papel muy importante en la vida acuática tanto animal como vegetal por lo que se determina su valor en el agua recogida en cada uno de los puntos mediante un pH-metro para conocer cómo podría afectar este parámetro a la vida que se desarrolla en el río.

3.3. Análisis microbiológico

La contaminación fecal es el principal problema en la calidad del agua de los ríos (Chapman, 1992), por lo que es importante determinar su presencia en las

aguas. Las bacterias coliformes fecales y coliformes totales se utilizan como indicadores de contaminación fecal, ya que, aunque no son nocivas en sí mismas, indican la presencia de bacterias patógenas, virus y protozoos que viven en los sistemas digestivos de humanos y animales (Spellman & Drinan, 2004).

Por lo tanto, a partir de las muestras de agua tomadas en cada punto se realiza el análisis microbiológico de coliformes totales, coliformes fecales y enterococos para detectar posible contaminación fecal, y *Pseudomonas* como bacteria ubicua en las aguas.

El análisis se realiza mediante la técnica de filtración de membrana a partir de un volumen de 50 ml de agua sobre un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro realizando dos réplicas de cada parámetro para cada punto a analizar.

Tabla 1. Medios de cultivo, temperaturas y tiempo de incubación para cada uno de los microorganismos analizados.

Bacteria	Medio de cultivo	Temperatura de cultivo (°C)	Tiempo de incubación (h)
Coliformes totales	endo	37	24
Coliformes fecales	m-FC	44	24
Enterococos	KF	37	48
<i>Pseudomonas</i>	agar de cetrimida	37	24

La composición de los distintos medios empleados es la siguiente:

Agar endo

Peptona	10 g/l
Lactosa	10 g/l
Fucsina básica	0,5 g/l
Sulfito sódico	2,5 g/l
Fosfato potásico	3,5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,2 (aprox.)

m-FC

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
Peptona	5 g/l
Sales biliares	1,5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
Lactosa	12,5 g/l
Azul de anilina	0,1 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,4+/- 0,2 g/l

Agar KF

Peptona	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
Glicerofosfato de sodio	10 g/l
Maltosa	20 g/l
Lactosa	1 g/l
Ázida sódica	0,4 g/l
Púrpura de bromocresol	0,015 g/l
Agar	20 g/l
pH	7,2+/-0,2

Agar de cetrimida

Gelatina de peptona	20 g/l
Cloruro magnésico	1,4 g/l
Sulfato potásico	10 g/l
Bromuro de Cetiltrimetil-Amonio	0,3 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,2+/-0,2 g/l

3.4. Crecimiento de *Chlamydomonas moewusii*

Las algas desempeñan el papel de productores primarios en el medio acuático (Bitton, 1994) y están presentes en todos los ambientes de agua dulce, siendo las algas verdes las que comprometen la clase más diversa de algas (Sigeo, 2005).

El género *Chlamydomonas* es un género cosmopolita de cerca de 500 especies frecuente en charcas, lagos o estanques, en aguas contaminadas ricas en nutrientes (Pérez Valcárcel, 2010). Puesto que este género puede utilizarse como indicativo de la calidad del agua debido a la características de crecimiento y la facilidad de manejo (Shubert, 1984), se lleva a cabo un estudio sobre el desarrollo de la microalga *Chlamydomonas moewusii* para comprobar la calidad del agua en cada uno de los puntos de muestreo.

El agua filtrada resultante del análisis microbiológico (agua estéril) es recogida y reservada para realizar un análisis del crecimiento de *Chlamydomonas moewusii* en cada uno de los puntos. Para ello, al igual que las bacterias, las microalgas son incubadas en un medio con nutrientes inorgánicos y se mantienen en unas condiciones de temperatura y luz constantes y determinadas para permitir su crecimiento óptimo.

El crecimiento de los cultivos es seguido diariamente por medidas de densidad óptica (D.O.=100-T) colocando una alícuota de cultivo en un espectrofotómetro y midiendo la transmitancia (T) a 530 nm frente a un blanco

de agua destilada (T=100%). Finalmente se realiza el cálculo de 100-T para obtener la forma de D.O. en que se representan los resultados.

3.5. Análisis de clorofilas de *Chlamydomonas moewusii*

Tras realizar la última medida de transmitancia, se realiza un análisis de las clorofilas *a* y *b* de *Chlamydomonas moewusii*, para lo cual se centrifuga el cultivo con el objetivo de obtener el precipitado al que se le añade acetona al 90% para extraer las clorofilas. Tras la incubación durante 24h a 4°C se vuelven a centrifugar para obtener el sobrenadante a partir del que se mide la absorbancia de las clorofilas *a* y *b* a 664 y 647nm respectivamente.

Una vez medidas las absorbancias, se lleva a cabo el cálculo de las concentraciones de pigmentos empleando las siguientes ecuaciones (Jeffrey & Humphrey, 1975):

$$\begin{aligned}[\text{Clorofila } a] &= 11'93 \cdot A_{664} - 1'93 \cdot A_{647} \\ [\text{Clorofila } b] &= 20'36 \cdot A_{647} - 5'5 \cdot A_{664}\end{aligned}$$

Dónde la concentración de pigmentos se expresa en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de extracto, y A_{664} y A_{647} representan las absorbancias medidas a 664, 647 respectivamente.

3.6. Tratamiento estadístico

Se realiza un análisis estadístico de los resultados del análisis microbiológico y de la densidad óptica. Puesto que el número de colonias ha sido incontable en todos los análisis salvo en el caso de los enterococos, sólo se le aplicará el análisis estadístico a este resultado.

Para cada experiencia realizada, se lleva a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%, para analizar la hipótesis nula de que no hay diferencias en la presencia de enterococos en los distintos puntos de muestreo y de que el crecimiento de *Chlamydomonas moewusii* es igual en todos los puntos de muestreo, respectivamente.

En los casos en que la hipótesis nula se rechace, se empleará el test de rango múltiple de Tukey, a un nivel de significación de 0.05 ($p < 0.05$), para analizar en qué puntos hay variaciones.

4. Resultados y discusión

4.1. pH

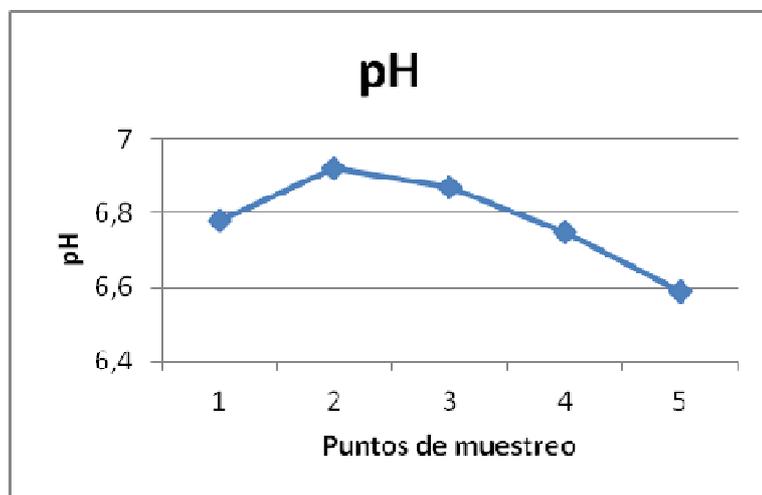


Figura 2. Variación de los valores de pH en los distintos puntos de muestreo.

Se observa una ligera tendencia a la acidificación del pH desde el nacimiento del río hasta su desembocadura, salvo en el primer punto de muestreo, donde encontramos un pH más ácido que los dos siguientes puntos (Fig.2).

A pesar de esto, se observa que el pH se mantiene prácticamente constante correspondiéndose con el pH característico de la mayoría de las aguas naturales que se encuentra entre 6 y 8,5, pudiendo darse valores más bajos en aguas diluidas de alto contenido orgánico y valores más altos en aguas eutróficas, salmueras y lagos salados (Chapman, 1992). Esto explica la bajada de pH en los últimos puntos de muestreo en los que se produce un aumento de materia orgánica proveniente de las aguas residuales residenciales.

Además, se aprecia que los valores de pH se encuentran entre los más favorables para la vida de las especies acuáticas que se sitúan entre los valores de 6 y 7,2 (Fundación MAPFRE, 1994).

4.2. Análisis microbiológico

4.2.1. Coliformes totales

Tras la incubación de coliformes totales no se ha observado crecimiento de los mismos en ninguna de las placas. Sin embargo, dado que se ha obtenido crecimiento de coliformes fecales, se deduce que ha ocurrido algún fallo en el medio de cultivo que ha impedido que estos crezcan.

Puesto que dentro de los coliformes totales hay especies que no son de origen fecal, los coliformes fecales son mejores indicadores de contaminación fecal por ser microorganismos procedentes del intestino humano (Pérez & Espigares García, 1999) y por lo tanto permiten obtener conclusiones fiables a pesar de la falta de datos sobre coliformes totales.

4.2.2. Coliformes fecales

Se han detectado coliformes fecales en todas las muestras analizadas. A pesar de que los resultados de colonias de coliformes fecales son incontables en todos los puntos de muestreo salvo en el primero, se aprecia claramente un aumento desde el nacimiento del río hasta su desembocadura (Fig. 3).

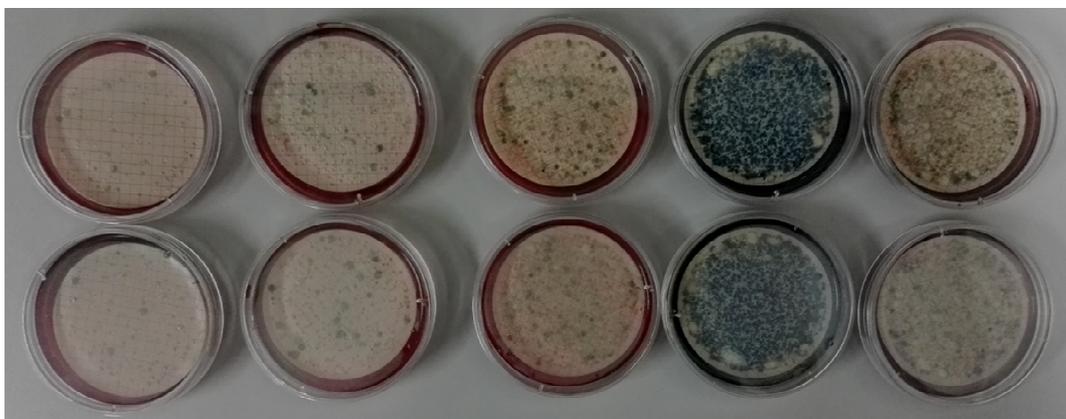


Figura 3. Resultados de coliformes fecales tras la incubación a 44°C durante 24h en medio m-FC. Las placas están ordenadas de izquierda a derecha del primer al último punto de muestreo correspondiéndose cada fila con una serie de réplicas.

Como era de esperar, la presencia de coliformes fecales en la primera zona de muestreo es muy baja (con una media de 14,5 colonias) ya que, por su carácter rural, las únicas actividades desarrolladas en esta zona son la agricultura y la ganadería, siendo precisamente la ganadería el factor que explica la detección de este tipo de bacterias en las aguas de estas zona. El segundo punto de muestreo presenta un incremento de coliformes fecales con respecto al primero asociado a un incremento de la actividad ganadera.

Puesto que con el tercer punto el curso del río se comienza a adentrar en zona urbana y recreativa, es lógico encontrar un incremento de bacterias fecales procedentes tanto las aguas residuales provenientes de las viviendas como de la presencia continua de actividades humanas y de animales de compañía en sus alrededores, lo que promueve la presencia de este tipo de contaminación.

En cuanto a la cuarta zona de muestreo, se puede observar una gran cantidad de coliformes fecales, destacando notablemente por encima de los otros puntos. El gran incremento de bacterias en una zona tan urbanizada muestra un tratamiento de aguas residuales inadecuado o insuficiente, descargando de esta forma en las aguas del río una gran cantidad de materia fecal sin tratar.

Por último, el quinto punto de muestreo presenta una disminución en la detección de coliformes fecales pese a su proximidad con el punto anterior y a la marcada urbanización que se continúa hasta esta zona. Este descenso se explica atendiendo a la situación especial de este punto, que se encuentra ubicado en la entrada de la ría, donde se produce una mezcla de aguas, que muy probablemente diluyen la contaminación que portan las aguas del río.

Aunque son muchas las enfermedades en las que el agua participa como mecanismo de transmisión, el grupo de infecciones denominadas gastrointestinales o de transmisión feco-hídrica presentan el agua como el principal mecanismo responsable de su transmisión (Pérez & Espigares García, 1999), por lo que es de especial importancia detectar este tipo de contaminación en las aguas.

Los coliformes fecales son bacterias que viven en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y son excretadas en los residuos sólidos de los seres humanos y otros mamíferos (Spellman & Drinan, 2004). Aunque generalmente estas bacterias no suponen peligro para el hombre ni para los animales, en los lugares en los que están presentes también lo están las bacterias causantes de dichas enfermedades (Spellman & Drinan, 2004) que pueden causar enfermedades importantes en el hombre como diarrea, disentería, cólera y fiebre tifoidea y, además, algunas de estas bacterias también pueden infectar heridas abiertas (Spellman & Drinan, 2004).

A diferencia de los coliformes fecales, las bacterias causantes de estas enfermedades no sobreviven mucho tiempo fuera del cuerpo de los animales, lo que hace que el seguimiento directo sea difícil (Spellman & Drinan, 2004) por lo que los coliformes fecales son usados normalmente como bioindicadores de estas bacterias.

Aunque la presencia de coliformes fecales afecta más al hombre que a las criaturas acuáticas (Spellman & Drinan, 2004) la materia fecal sin tratar incrementa el contenido en materia orgánica del agua y la descomposición de esta materia orgánica agota el oxígeno disuelto en el agua y puede ocasionar la muerte de peces y otros seres vivos acuáticos (Spellman & Drinan, 2004). Por este motivo es importante controlar la presencia de estas bacterias en el agua, no sólo por su impacto en los seres humanos sino también por su posible impacto en el ecosistema.

4.2.3. Enterococos

Se ha detectado la presencia de enterococos en todas las muestras analizadas. En la en la Fig.2 se aprecia que no hay un patrón claro de aumento de enterococos, sin embargo se ve que la cantidad en el segundo y cuarto punto de muestreo es superior al resto, de forma que el segundo punto presenta diferencias estadísticamente significativas (al 95%) frente a los puntos 1 y 3 y el cuarto punto presenta diferencias estadísticamente significativas (al 95%) únicamente frente al primer punto. El resto de puntos de muestreo no presentan diferencias significativas entre sí.

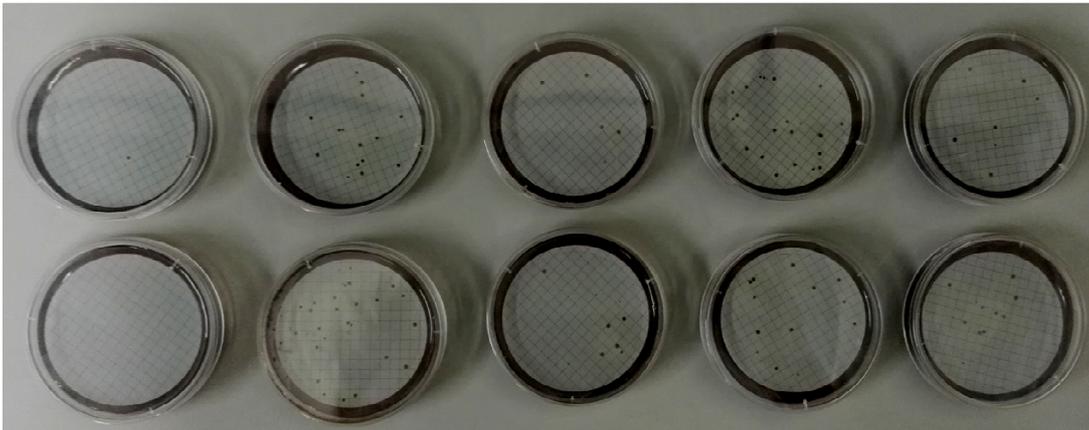


Figura 4. Resultados de enterococos tras la incubación a 37°C durante 48h en medio KF. Las placas están ordenadas de izquierda a derecha del primer al último punto de muestreo correspondiéndose cada fila con una serie de réplicas.

Debido a que son las bacterias más resistentes a los antibióticos, las especies de enterococos son muy temidas como causa de enfermedad (Salyers & Whitt, 2001). Esto es especialmente problemático en el sentido de que los genes para la resistencia a los antimicrobianos se producen en plásmidos que pueden ser transferidos a otras bacterias (Bauman, 2007).

Dentro del género, cabe destacar la relevancia de *Enterococcus faecalis* cuya especie provoca infecciones en el tracto urinario y se transmite a través de la inhalación de gotas contaminadas o a través de alimentos/aguas contaminadas (Baker *et al.*, 2007). Se encuentra un pequeño número de *E. faecalis* en el tracto respiratorio alto y en el intestino delgado, mientras que la cantidad es mucho mayor en el intestino grueso (Murray *et al.*, 1997).

La determinación de los enterococos es un valioso indicador para determinar la extensión de la contaminación fecal de las aguas superficiales de recreo, ya que se encontró que la incidencia de la gastroenteritis asociada a la natación está directamente relacionada con la concentración de estas bacterias (Mitchell, 1992).

Puesto que los enterococos son bacterias muy resistentes, su presencia indica una contaminación lejana en el tiempo y pese a que se han detectado enterococos en todos los puntos, la cantidad en la mayoría de ellos es muy baja, por lo que su presencia no supone riesgo para la salud.

4.2.4. *Pseudomonas*

Como ya se ha mencionado, en el agua también pueden existir otros microorganismos no específicamente patógenos pero que sin embargo, pueden provocar pequeñas infecciones, que toman mayor gravedad cuando se trata de personas mayores, niños o enfermos, como es el caso de *Pseudomonas* (Pérez & Espigares García, 1999).

Pseudomonas es ubicua en el suelo, la materia orgánica en descomposición, y casi todos los ambientes húmedos, incluyendo piscinas, jacuzzis, esponjas, paños de lavado y soluciones de lentes de contacto (Bauman, 2007). Dentro del género *Pseudomonas*, la especie *Pseudomonas aeruginosa* es la especie con significado clínico más común y constituye el miembro del género mejor caracterizado (Murray *et al.*, 1997).

Se ha detectado la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en todos los puntos analizados (Fig.5). Sin embargo, puesto que tiene requerimientos nutricionales mínimos y puede tolerar una amplia gama de temperaturas siendo resistente a muchos antibióticos y desinfectantes, la simple recuperación de *Pseudomonas* en una fuente ambiental significa muy poco sin evidencias epidemiológicas de que la zona contaminada actúa como reservorio de infección (Murray *et al.*, 1997).

Por este motivo, la presencia de esta especie no supone peligro a no ser que se presenten casos continuados de infección por *Pseudomonas* en alguna de las zonas de muestreo.

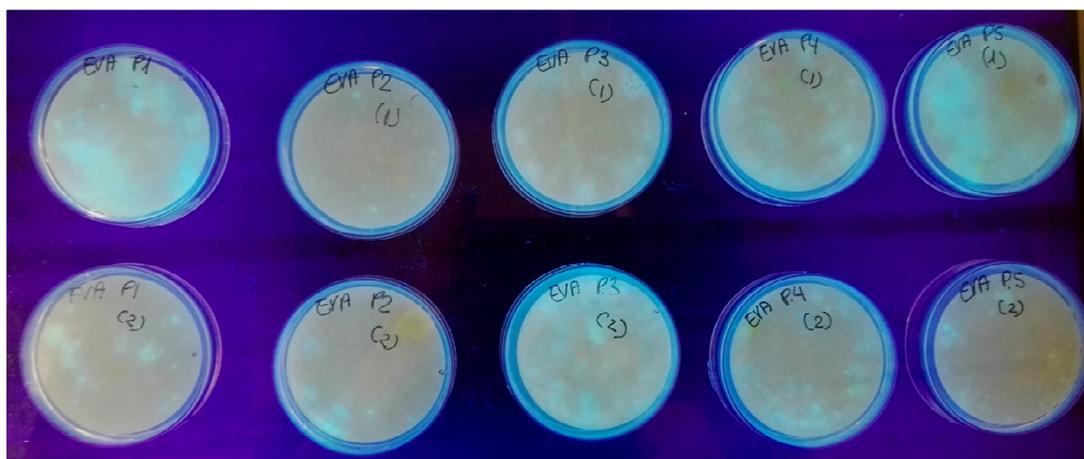


Figura 5. Resultados de *Pseudomonas aeruginosa* tras la incubación a 37°C durante 24 h en medio de agar de cetrimida. Las placas están ordenadas de izquierda a derecha del primer al último punto de muestreo correspondiéndose cada fila con una serie de réplicas.

A pesar de los muchos factores de virulencia de *P. aeruginosa* y su capacidad de vivir en casi todos los ambientes húmedos, rara vez causa enfermedad. La razón por la que es sólo un oportunista raro y no un patógeno común y formidable es que *P. aeruginosa* no puede penetrar las estructuras intactas, las células y las defensas químicas de la piel (Bauman, 2009) de forma que la transmisión de *P. aeruginosa* se realiza mediante la exposición de la superficie epitelial dañada a las superficies contaminadas, siendo el agua la forma más común de transmisión (Baker *et al.*, 2007). De no ser así, la ubicuidad y la resistencia inherente de *Pseudomonas* a una amplia gama de agentes antimicrobianos la convertirían en uno de los microbios más virulentos y un desafío casi insuperable para los profesionales de la salud (Bauman, 2009).

Una vez que rompe la piel o las membranas mucosas, *P. aeruginosa* puede colonizar exitosamente casi cualquier órgano y sistema. Además de las infecciones de la piel, puede estar involucrado en bacteriemia, endocarditis, e infecciones urinarias, del oído, de los ojos, del sistema nervioso así como infecciones gastrointestinales, musculares y esqueléticas (Bauman, 2009).

La presencia de *Pseudomonas* es especialmente importante para el desarrollo de actividades recreativas en las aguas del río como son la natación o simplemente el baño en sus aguas. Los nadadores pueden desarrollar otitis externa, también llamada oído del nadador, que es una infección dolorosa de *Pseudomonas* del canal auditivo externo (Bauman, 2009). Por este motivo es importante controlar la presencia de esta bacteria en los últimos puntos de muestreo asociados con actividades recreativas.

4.3. Crecimiento *Chlamydomonas moewusii*

Chlamydomonas moewusii ha crecido en todos los cultivos realizados a partir de las muestras de agua recolectadas del estudio de la calidad microbiológica. En la Fig.6 se puede observar que en los tres últimos puntos de muestreo se produce un mayor crecimiento que en los dos primeros, siendo el tercer punto el que muestra el mayor crecimiento de todos ellos.

Al analizar estadísticamente los datos se manifiesta que este tercer punto muestra diferencias estadísticamente significativas (al 95%) frente al primer y segundo punto de muestreo. Además, se aprecia que la segunda zona de muestreo presenta diferencias estadísticamente significativas (al 95%) frente al cuarto y quinto punto. El resto de puntos no presentan diferencias estadísticamente significativas (al 95%) entre sí.

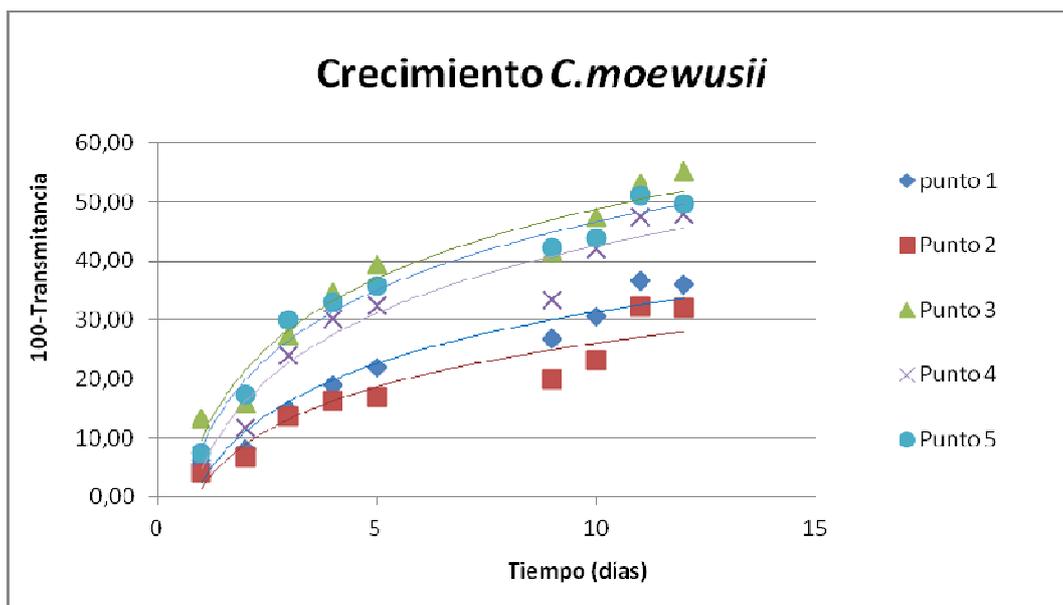


Figura 6. Crecimiento de *Chlamydomonas moewusii* (expresado como evolución de la densidad óptica en el tiempo) cultivada en agua filtrada procedente de cada punto de muestreo del río Mero.

Al atender a las ecuaciones de las líneas de tendencia logarítmicas representadas en la Tabla 1 se puede ver igualmente que el crecimiento es mayor y más rápido en los tres últimos puntos. Además, el valor de R^2 es, en todos los casos, superior a 0,8, lo que indica un buen ajuste de la línea logarítmica a los datos representados.

Tabla 2. Ecuación de la línea de tendencia logarítmica y valor de R^2 del crecimiento de *C. moewusii* en cada uno de los puntos de muestreo.

	Ecuación log	R^2
Punto 1	$y = 12,624\ln(x) + 2,269$	0,9386
Punto 2	$y = 10,695\ln(x) + 1,3941$	0,8822
Punto 3	$y = 17,019\ln(x) + 9,5822$	0,9448
Punto 4	$y = 16,458\ln(x) + 4,643$	0,9401
Punto 5	$y = 16,69\ln(x) + 8,1633$	0,9738

Aunque la mayoría de las algas de agua dulce son fotoautótrofas, realizan fotosíntesis y obtienen compuestos orgánicos complejos de precursores inorgánicos, algunas también tienen capacidad para la nutrición heterotrófica.

De esta forma, tienen capacidad para complementar su estilo de vida autotrófico con la absorción de complejos de carbono orgánico del medio ambiente para la obtención de energía, el metabolismo y el crecimiento (Sigeo, 2005).

Atendiendo a la situación de los puntos de mayor crecimiento de *Chlamydomonas moewusii* se deduce que las aguas residuales provenientes de las viviendas situadas en los alrededores del río añaden a sus aguas una alta cantidad de materia orgánica que puede ser empleada por *C. moewusii* para su metabolismo.

En cuanto al pH, las microalgas muestran una clara dependencia respecto a este de forma que un descenso del pH suele ser letal, soportando mejor los incrementos del pH, hasta un cierto límite (Abalde *et al.*, 1995). Puesto que en los puntos donde el pH es menor no se observa un descenso de su crecimiento podemos deducir que el pH del agua no influye sobre *Chlamydomonas moewusii* siendo un pH apropiado para su crecimiento.

4.4. Análisis de las clorofilas

Al analizar las clorofilas se obtiene que la cantidad de clorofila es proporcional al crecimiento observado, lo que indica que pese a que *Chlamydomonas moewusii* puede apoyar su metabolismo con los aportes de materia orgánica proveniente de las aguas domésticas, su base se encuentra en el metabolismo autótrofo, ya que la cantidad de clorofila no disminuye en los puntos donde hay una mayor cantidad de materia orgánica.

Se observa además, que la proporción de clorofilas *a/b* es igual en todos los puntos, lo que nos indica que no hay alteraciones en el aparato fotosintético en ninguno de los puntos.

Tabla 3. Valores de concentraciones de las clorofilas *a* y *b* (en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de *Chlamydomonas moewusii* y valores de densidad ópticas correspondientes al último día de toma de datos.

	100-T	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	<i>a/b</i>
Promedio P1	35,9	6,28	1,54	4,08
Promedio P2	31,93	3,96	0,95	4,17
Promedio P3	55	9,28	2,28	4,07
Promedio P4	47,75	6,88	1,69	4.07
Promedio P5	49,567	6,36	1,49	4,27

5. Conclusiones

-De las distintas fuentes de contaminación a las que se ven expuestas las aguas del río Mero a lo largo de su trayecto, las aguas residuales urbanas, así como las actividades recreativas asociadas a sus alrededores, parecen ser las únicas que están causando problemas en el mantenimiento de su calidad.

-La gran cantidad de coliformes fecales en los últimos puntos de muestreo junto con el mayor crecimiento de *C. moewusii* en estos puntos muestran un tratamiento de aguas residuales insuficiente que porta al agua del río gran cantidad de materia orgánica y contaminación fecal, por lo que deja en evidencia la necesidad de mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales para evitar los posibles problemas de salud producidos por las bacterias causantes de enfermedades asociadas con las bacterias coliformes detectadas.

-La calidad del agua y el pH son favorables para la vida acuática, tanto vegetal como animal. Sin embargo, si el contenido de materia orgánica vertida a las aguas continúa en aumento, podría acabar causando problemas en el mantenimiento de la vida asociada al río al provocar carencias de oxígeno.

Conclusión

-Das distintas fontes de contaminación ás que están expostas as augas do río Mero ó longo do seu traxecto, as augas residuais urbanas, así como as actividades recreativas asociadas ó seu ambiente, parecen ser as únicas que están causando problemas no mantemento da súa calidade.

-A gran cantidade de coliformes fecais no últimos puntos de mostraxe xunto co maior crecemento de *C. moewusii* nestes puntos mostra un tratamento de augas residuais insuficiente que portan á auga do río gran cantidade de materia orgánica e contaminación fecal, polo que deixa en evidencia a necesidade de mellorar os sistemas de tratamento de augas residuais para evitar os posibles problemas de saúde producidos polas bacterias causantes de enfermidades asociadas coas bacterias coliformes detectadas.

-A calidade da auga e o pH son favorables para a vida acuática, tanto vexetal como animal. Con todo, se o contido de materia orgánica vertida ás augas continua en aumento, podería acabar causando problemas no mantemento da vida asociada ó río ao provocar carencias de osíxeno.

Conclusions

-Of the different sources of pollution to which the Mero River waters are exposed along the way, urban wastewaters, as well as recreational activities associated with its surroundings, appear to be the only ones causing problems in the maintenance of its quality.

- In the last sample points a great amount of faecal coliforms and a higher growth of *Chlamydomonas moewusii* show the lack of wastewaters treatment, that gives to the water a large quantity of organic matter and faecal contamination. This facts indicate the necessity of improving wastewaters treatment systems for avoiding possible health problems associated with the coliforms we have found.

-Water quality and pH are favorable for aquatic life, both, plants and animals, but the faecal contamination detected in the waters can affect human population. However, if the organic matter content continues to increase, it could cause oxygen deficiencies that would lead into problems with the life associated to the river.

6. Bibliografía

- Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, J.P.; Torres, E.; Herrero, C. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. A Coruña: Universidade da Coruña.
- Baker, S.; Nicklin, J.; Khan, N.; Killington, R. (2007). *Microbiology*. New York: Taylor&Francis.
- Bauman, R. (2007). *Microbiology with diseases by taxonomy*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Bauman, R. (2009). *Microbiology with diseases by body system*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Bitton, G. (1994). *Wastewater microbiology*. New York: Wiley-Liss.
- Chapman, D. (Ed.). (1992). *Water quality assessments*. London: Chapman & Hall.
- Fundación MAPFRE (Ed.). (1994). *Manual de contaminación ambiental*. Madrid: Editorial MAPFRE.
- Jeffrey, S. W.; Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton, *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 167:191-194
- Lenart-boro, A. (2017). The effect of anthropogenic pressure shown by microbiological and chemical water quality indicators on the main rivers of Podhale , southern Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 12938–12948.
- Mitchell, R. (Ed.). (1992). *Environmental microbiology*. New York: Wiley-Liss.
- Murray, P.R.; Kobayashi, G.S.; Pfaller, M.A.; Tenover, K.C.; Tenover, K.S. (1997). *Microbiología médica*. Madrid: Harcourt Brace.
- Pérez López, J.A.; Espigares García, M. (Ed.). (1999). *Estudio sanitario del agua*. Granada: Editorial Universidad de Granada.
- Pérez Valcárcel, C. (2010). *Guía dos microorganismos das augas continentais*. A Coruña: Baía edicións.
- Salyers, A.A.; Whitt, D. (2001). *Microbiology diversity, disease, and the environment*. Bethesda, Maryland: Editorial Offices.
- Shubert, L.E. (Ed.). (1984). *Algae as ecological indicators*. London: Academic press.
- Sigee, D. (2005). *Freshwater microbiology*. Chichester: Wiley.

- Spellman, F.R., & Drinan, J. (2004). *Manual del agua potable*. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Wang, Y.; Chen, Y.; Zheng, X.; Gui, C.; Wei, Y. (2017). Spatio-temporal distribution of fecal indicators in three rivers of the Haihe River Basin, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 9036–9047.