



TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA

Título: “Análisis microbiológico de los limnoembalses de cola de Castilla La-Mancha”

Autor: Beatriz López Olayo

Tutor: Jorge Pérez Serrano

Curso:2015-2016

COMISIÓN DOCENTE

AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

D/D^a Jorge Pérez Serrano
Profesor del Departamento de Biomedicina y Biotecnología
como tutor del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de
D/D^a Beatriz López Olayo

Titulado: "Análisis microbiológico de los limnoembalses de cola de Castilla La-Mancha"

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por el/la mencionado/a alumno/a bajo mi dirección y con esta fecha autorizo a su presentación y defensa pública

Alcalá de Henares 7 de julio de 2016

Fdo:



Índice

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
PALABRAS CLAVE	5
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. MICROBIOLOGÍA ACUÁTICA	6
1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS AGUAS.....	6
1.3. CONCEPTO DE LIMNOEMBALSE	8
1.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS RECREATIVAS.....	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. TOMA DE MUESTRAS.....	11
3.1.1. <i>Localización de las muestras</i>	11
3.1.2. <i>Profundidad</i>	11
3.1.3. <i>Espacio temporal</i>	12
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	12
3.3. INOCULACIÓN Y SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO.....	14
3.4. INCUBACIÓN EN ESTUFA.....	15
3.5. ANÁLISIS DE CONTAMINACIÓN FECAL.....	15
3.5.1. <i>Colimetría presuntiva</i>	16
3.5.2. <i>Colimetría confirmativa</i>	17
3.6. RECUENTO DE MICROORGANISMOS.....	17
4. RESULTADOS	17
4.3. PRIMAVERA.....	18
4.4. VERANO	19
4.5. OTOÑO.....	20
4.6. INVIERNO.....	21
5. DISCUSIÓN	24
5.1. CALIDAD ECOLÓGICA	24
5.2. CONTAMINACIÓN FECAL	26
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	28
LISTADO DE ABREVIATURAS	30

RESUMEN

El agua es un recurso natural, limitado y escaso, indispensable para la vida. La creación de embalses supone una garantía de suministro de agua, pero conlleva un importante impacto negativo en el medio ambiente. La construcción de embalses de cola (denominados limnoembalses) es una iniciativa innovadora que pretende acabar con los efectos negativos de los embalses, teniendo además un gran interés por contar con dos funciones básicas: una recreativa y otra ambiental. En este trabajo nos centramos en el análisis microbiológico de las aguas de limnoembalses de Castilla-La Mancha para determinar su calidad y prevenir posibles infecciones por contaminación fecal. Para realizar el análisis se tomaron muestras en tres ubicaciones distintas: el limnoembalse de Pareja, El Vicario y Presa Verde; y los correspondientes ríos que los abastecen. Las muestras se tomaron en las 4 estaciones del año y a distintas profundidades. Los resultados del análisis mostraron que los valores de contaminación fecal presentes en los limnoembalses cumplían con lo establecido en el Real Decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. Además, la calidad ecológica de las aguas de los embalses y los ríos pudo ser considerada como buena.

ABSTRACT

Water is a natural, limited and scarce resource essential for life. The creation of reservoirs is a guarantee of water supply, but it brings a significant negative impact on the environment. The construction of dams tail (called limnoembalses) is an innovative initiative which aim is to eliminate the negative effects of the reservoirs, having besides a great interest in having two basic functions: both recreational and environmental. This paper is focused on the microbiological analysis of the limnoembalses waters of Castilla-La Mancha with the objective of determine its quality and prevent infections by fecal contamination. To perform the analysis, the samples were taken at three different locations: the limnoembalse of Pareja, El Vicario and Presa Verde; and the corresponding rivers that supply them. Samples were taken in the 4 seasons of the year and at different depths. The results of the analysis showed that the values of fecal contamination present in the limnoembalses fulfill with

the provisions of the Real Decreto 1341/2007 on the management of the quality of bathing water. In addition, the ecological quality of water reservoirs and rivers could be considered as good.

PALABRAS CLAVE

“Limnoembalses” “Coliformes totales y fecales”, “Enterococos”, “Calidad de las aguas de baño”.

1. Introducción

El agua es un recurso natural, limitado y escaso, indispensable para la vida. En el año 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente “el derecho humano al abastecimiento de agua y al saneamiento; todas las personas tienen derecho a disponer de forma continuada de agua suficiente, salubre, físicamente accesible, asequible y de una calidad aceptable, para uso personal y doméstico” (Anon., 2010).

El 97,5% del agua del planeta es salada, mientras que el 2,5% restante es agua dulce. Sin embargo, la mayoría del agua dulce no puede aprovecharse para el uso humano, ya que se encuentra en forma de glaciares, depósitos subterráneos y demás lugares inaccesibles para la población. De todos estos reservorios, el 0,3% pertenece al agua de los ríos y lagos (Fernández Crespo, et al., 2003).

La creación de embalses supone una garantía de suministro de agua en épocas de sequía, pero también hay que tener en cuenta el impacto negativo que estos crean en el medio ambiente. Los embalses producen alteraciones en los ecosistemas de los ríos donde se construyen. Además, es importante controlar su contaminación, ya que pueden acarrear serios problemas de salud en las poblaciones que se benefician de su construcción.

Según la OMS, “se calcula que unas 842.000 personas mueren cada año de diarrea como consecuencia de la insalubridad del agua, de un saneamiento insuficiente o de una mala higiene de las manos”. Se considera que el agua está contaminada, cuando su composición microbiológica o estado natural se ven modificados, presentando alteraciones en sus propiedades físicas y/o

químicas que resultan perjudiciales para un uso posterior como el consumo humano o para su función ecológica.

1.1. Microbiología acuática

Las masas de agua dulce, características por su baja concentración en sales disueltas, pueden presentar superficies y volúmenes variados. De la misma manera, los microorganismos que habitan estos sistemas pueden variar enormemente en sus características, ya que son capaces de adaptarse a las condiciones en las que se desarrollan. Este hecho da lugar a una gran diversidad de ambientes acuáticos (Willey, et al., 2008).

Los microorganismos que habitan los sistemas acuáticos dependen de factores como la temperatura, la luz, el oxígeno, los nutrientes, y el pH. La temperatura se convierte en uno de los factores más importantes y limitantes del crecimiento bacteriano. Por ello, dependiendo de la estación del año en la que nos encontramos, se producen variaciones en la microbiota de estos sistemas.

1.2. Clasificación de las aguas

Dependiendo del flujo que sigan las aguas podemos dividirlos en dos grandes grupos: aguas lénticas, que son aquellas que carecen de corrientes y se encuentran sin movimiento aparente; y aguas lólicas, caracterizadas por corrientes rápidas.

Los ríos están clasificados dentro del grupo de aguas lólicas. El continuo movimiento de sus aguas implica que se trata de un ambiente aerobio. La entrada masiva de materia orgánica puede dar lugar a un déficit en la concentración de oxígeno debido a la respiración bacteriana. Este suceso se trata de un hecho indeseable, ya que puede provocar la muerte de muchos de los microorganismos aerobios que habitan estos medios, además de que puede acarrear consecuencias negativas como el crecimiento de bacterias anaerobias odoríferas.

Las aguas lénticas abarcan masas de agua como los embalses. El hecho de que estas aguas se encuentren depositadas, provoca que la producción fotosintética de oxígeno sólo se lleve a cabo en las capas superficiales, donde la luz está más presente. La materia orgánica producida por los microorganismos fotosintéticos será utilizada por los quimiorganotrofos. Debido

a estas circunstancias, la microbiota habitual de estos ecosistemas se basa en la presencia de microorganismos oligotrofos, que son organismos adaptados al crecimiento en condiciones muy diluidas, es decir, con un mínimo aporte de nutrientes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los aportes desde la orilla que rodea los embalses pueden dar lugar a una mayor concentración de nutrientes y de dos elementos que son limitantes en el agua y controlan las poblaciones microbianas, como son el nitrógeno y el fósforo. Este aumento hará que el crecimiento de fitoplancton sea mayor y, en definitiva, que aumente el contenido de materia orgánica en el lago.

En función de la cantidad de nutrientes que presentan los lagos, estos se dividen de forma general en oligotróficos y eutróficos. Los primeros presentan aguas oxigenadas todo el año debido a la baja concentración en nutrientes presentes, que hace que no haya una respiración aerobia masiva por parte de los microorganismos. Las aguas son muy claras permitiendo que la luz penetre con facilidad, pudiendo llegar hasta el fondo. En los lagos eutróficos, sin embargo, se produce una estratificación basada fundamentalmente en la temperatura que separa el agua en tres capas: el epilimnion (capa superficial de aguas templadas, donde hay oxígeno y luz, y por lo tanto microorganismos aerobios), la termoclina (zona de transición caracterizada por un cambio brusco de la temperatura, situándose a una altura dependiente de la turbidez de las aguas) y el hipolimnion (zona del fondo, donde aparecerán microorganismos anaerobios). El epilimnion y el hipolimnion no se mezclan al constituirse la termoclina como una autentica barrera física que lo impide. Es común que aparezcan sedimentos orgánicos en el fondo que sufren procesos anaerobios dando lugar al desprendimiento de H_2S por los microorganismos reductores del sulfato, generándose así un gradiente de concentración del mismo (mayor en el fondo y menor antes de la termoclina). Con la llegada del otoño, estos lagos pierden su termoclina debido a la dilatación anómala del agua, ya que las aguas de superficie aumentan su densidad al disminuir la temperatura exterior y se produce una mezcla de las 2 capas (Willey, et al., 2008).

Cabe destacar que en los embalses ubicados en climas templados como el de España, se produce la estratificación durante la primavera y el verano, y a finales del otoño principios del invierno, se produce un enfriamiento de las

aguas superficiales, lo que provoca, como ya se ha mencionado anteriormente, una mezcla y consecuente aireación de las aguas del fondo del embalse que se traduce en una alteración de la composición microbiana (Madigan, et al., 2009).

1.3. Concepto de limnoembalse

En España existen más de 1.200 grandes presas, de las cuales 450 son anteriores a 1960 y más de 100 ya existían en el año 1915 (Ministerio de Agricultura, 2016). A nivel mundial, el número de presas asciende a 36.000 (Willey, et al., 2008). Muchas naciones han reconocido las consecuencias devastadoras de su construcción inadecuada, además de los efectos negativos que provocan. Por ello, para su construcción cada vez es necesario cumplir un mayor número de requisitos, entre los que cada vez cobran más importancia los referidos al medioambiente.

El concepto de “limnoembalse de cola” es un término reciente, que abarca “pequeños embalses, individualizados de la dinámica hidrológica y de explotación del embalse principal, que están diseñados para mantener una lámina de agua a nivel constante” (Molina Navarro, 2010). La construcción de limnoembalses de cola es una iniciativa innovadora, tanto en España, como en el mundo, buscando conseguir con ellos la reducción o desaparición de los efectos negativos de los embalses.

Los limnoembalses comenzaron a aparecer entre los años 1980 y 1990 (Rodríguez Cabellos, 1995). El limnoembalse de Pareja fue uno de los primeros en construirse (2006). Su construcción vino desencadenada por la protesta de los habitantes de la región donde se ubica, en la provincia de Guadalajara, debido a la transferencia de grandes volúmenes de agua del Embalse de Entrepeñas (del que procede) al sureste de España (Molina Navarro, 2008). Los vecinos del pueblo de Pareja pidieron actos de compensación que condujeron a la construcción de una pequeña presa en el borde del embalse. Este limnoembalse cuenta con un gran interés porque tiene dos funciones básicas: una recreativa y otra ambiental. Los limnoembalses construidos anteriormente, sin embargo, tan solo presentaban el fin de crear un hábitat para las aves acuáticas. En definitiva, en Pareja además del objetivo ecológico, se

pretende promover el desarrollo económico, llevándose a cabo actividades de deportes acuáticos y utilizándose a su vez para el baño.

1.4. Análisis microbiológico de las aguas recreativas

El uso recreativo que se le da a los limnoembalses hace necesaria su clasificación dentro de las aguas de baño que, según el Real Decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño (Ministerio de la Presidencia, 2007) se definen como: “cualquier elemento de aguas superficiales donde se prevea que puedan bañarse un número importante de personas o exista una actividad cercana relacionada directamente con el baño y en el que no exista una prohibición permanente de baño ni se haya formulado una recomendación permanente de abstenerse del mismo y donde no exista peligro objetivo para el público”. Este hecho es importante, ya que la contaminación de este tipo de aguas supone una de las vías de entrada más importantes de agentes infecciosos, pudiendo causar numerosas enfermedades en el ser humano, y suponiendo por ello una importante fuente de mortalidad/morbilidad.

Dentro de las infecciones provocadas por microorganismos a través de las aguas contaminadas, las gastroenteritis, las dermatitis y las meningoencefalitis son las más frecuentes. Son propagadas al tragar, inhalar partículas o mantener contacto con ellas y el número de patógenos necesarios para causar la infección, depende del sistema inmune del huésped y la patogenicidad del microorganismo.

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), las personas tienen en promedio alrededor de 0,14 gramos de heces en la región perianal que, cuando se desprenden, pueden contaminar el agua en lugares de recreación acuática.

Para evitar la contaminación de las aguas, y su consecuente riesgo para la salud humana, siguiendo el Real Decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño, se

ANEXO I
Parámetros obligatorios y valores para la evaluación anual
Agua continental

		Calidad			Unidad
		Suficiente **	Buena *	Excelente *	
01	Enterococos intestinales.	330	400	200	UFC o NMP/100 ml.
02	Escherichia coli.	900	1.000	500	UFC o NMP/100 ml.

Agua costera y de transición

		Calidad			Unidad
		Suficiente **	Buena *	Excelente *	
01	Enterococos intestinales.	185	200	100	UFC o NMP/100 ml.
02	Escherichia coli.	500	500	250	UFC o NMP/100 ml.

Figura 1. Parámetros microbiológicos a cumplir según Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño

deben controlar analíticamente, al menos, los parámetros que figuran en su anexo I.

Como se hace constar en la Figura 1, los parámetros obligatorios se basan en la valoración de dos grupos de bacterias diferentes: los enterococos intestinales (*Streptococcus faecalis*) y *Escherichia coli*, ambos de origen intestinal. El primero se trata de cocos en cadenas gram positivos, clasificados en el grupo D de Lancefield. *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo perteneciente al grupo de las enterobacterias.

Por otro lado, la bacteria *Clostridium perfringens*, que habita en el aparato digestivo del ser humano y de los animales, aparece con frecuencia en el suelo y en el agua contaminada por heces. Se trata de un bacilo gram positivo, anaerobio, con capacidad para esporular e inmóvil, que puede asociarse con una simple colonización, o llegar a poner en riesgo la vida. Dicho microorganismo provoca infecciones de los tejidos blandos (como la celulitis, la fascitis o miositis supurativa, y la mionecrosis o gangrena gaseosa), intoxicaciones alimentarias y septicemia primaria (Murray, et al., 2009).

2. Objetivos

Como consecuencia de la reciente aparición de los limnoembalses, se está llevando a cabo un proyecto que incluye estudios microbiológicos, físico-químicos, limnológicos e hidrológicos sobre ellos. En este trabajo nos centramos en el análisis microbiológico de las aguas de limnoembalses de tres ubicaciones distintas: el limnoembalse de Pareja, El Vicario y Presa Verde. Este trabajo es de gran importancia ya que la construcción de limnoembalses sigue una tendencia creciente en España, y en la actualidad se han realizado muy pocos estudios de estas características.

El objetivo general de este trabajo es:

1. Determinar la evolución de la microbiota presente en los limnoembalses de Pareja, El Vicario y Presa Verde desde mayo de 2015 a enero de 2016, haciendo un seguimiento en función de las 4 estaciones del año.

Los objetivos específicos son:

1. Análisis de la calidad ecológica de los limnoembalses.
2. Análisis de la contaminación fecal de los limnoembalses.

3. Materiales y métodos

3.1. Toma de muestras

La toma de muestras es un paso muy importante en el análisis microbiológico. Es necesario crear condiciones de esterilidad en la recogida para asegurar que los grupos de microorganismos que se determinan proceden exclusivamente de las muestras, y no son parte de contaminación ajena a ellas. Además, la muestra debe ser representativa de los limnoembalses, debe contener una cantidad de agua suficiente para su análisis, y debe ser correctamente etiquetada en el momento de la recogida.

Las muestras fueron recogidas en botellas estériles de plástico de 1,5 L. El encargado de tomarlas fue el grupo de investigación del Departamento de Geología, Geografía y Medio ambiente de la Universidad de Alcalá, liderado por los Drs. Silvia Martínez y Antonio Sastre.

3.1.1. Localización de las muestras

El limnoembalse El Vicario ($39^{\circ}03'32.8''N$, $3^{\circ}59'48.2''W$) se encuentra ubicado en la provincia de Ciudad Real y fue construido en el año 1973. Dicho embalse es abastecido por el río Bañuelos, principal afluente del río Guadiana.

La Presa Verde es el limnoembalse de cola perteneciente al Embalse Torre de Abraham ($39^{\circ}23'48.5''N+4^{\circ}14'52.8''W$). Se encuentra en la provincia de Ciudad Real, en el término municipal de Retuerta del Bullaque, y es abastecido por este mismo río, el Bullaque, el cual también pertenece a la cuenca hidrográfica del Guadiana.

Por último, el limnoembalse de Pareja ($40^{\circ}32'59.1''N+2^{\circ}42'34.5''W$) se encuentra al sur de la provincia de Guadalajara, en la cabecera de la cuenca del Tajo, y es alimentado por el río Ompólveda.

3.1.2. Profundidad

En el Limnoembalse El Vicario (Figura 2) se recogieron muestras en la superficie, 3 m y 6 m de profundidad en la presa, en la superficie y 3 m de profundidad en la zona media, y en la

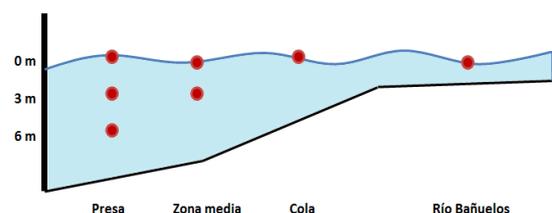


Figura 2. Puntos de muestreo en el limnoembalse El Vicario y el río Bañuelos.

superficie de la cola y río Bañuelos.

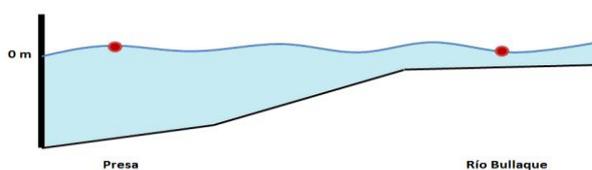


Figura 3. Puntos de muestreo en el limnoembalse Presa Verde y el río Bullaque.

En la Presa Verde (Figura 3) se recogieron muestras de la superficie de ésta misma presa, y del río que la alimenta, el río Bullaque.

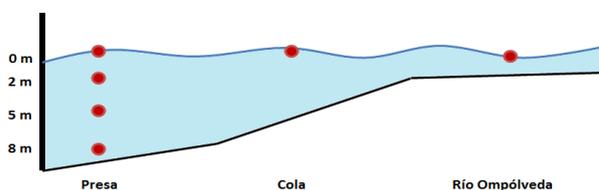


Figura 4. Puntos de muestreo en el limnoembalse de Pareja y el río Ompólveda.

En el Limnoembalse de Pareja (Figura 4) se recogieron muestras en la superficie, 2 m, 5 m y 8 m de la presa y en la superficie de la cola y el río Ompólveda, encargado de abastecer al limnoembalse.

3.1.3. Espacio temporal

Para tener información de la evolución de las aguas en función de la estación del año, se hicieron 4 muestreos: el correspondiente a la primavera en mayo de 2015, el de verano en julio de 2015, el de otoño en octubre de 2015, y el de invierno en enero de 2016.

3.2. Medios de cultivo

Dependiendo de las características de cada microorganismo, se necesitan unos requerimientos distintos para que su crecimiento sea el adecuado. Por ello, la composición de los medios de cultivo utilizados en el análisis varía ampliamente. Los medios utilizados fueron:

1. Agar Sabouraud: Medio de cultivo sólido, selectivo para hongos. Presenta un pH ácido y un alto contenido en glucosa y cloranfenicol, lo que inhibe el crecimiento de la gran mayoría de bacterias tanto gram positivas como negativas. Composición: *peptona* (15,00 g/L), *glucosa* (40,00 g/L), *cloranfenicol* (0,05 g/L), *agar* (15,00 g/L).
2. Agar Slanetz-Bartley: Medio de cultivo sólido, selectivo para enterococos. La triptosa aporta nitrógeno, vitaminas y aminoácidos esenciales para el crecimiento. La glucosa es el carbohidrato que aporta energía y el fosfato

dipotásico actúa como tampón. La azida sódica se encarga de inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas. Composición: *triptosa* (20,00 g/L), *extracto de levadura* (5,00 g/L), *glucosa* (2,00 g/L), *fosfato dipotásico* (4,00 g/L), *azida sódica* (0,40 g/L), *agar* (12,00 g/L).

3. [Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina \(SPS\)](#): Medio de cultivo sólido, selectivo para la recuperación de *Clostridium perfringens*. El citrato férrico y el sulfito de sodio son indicadores de la producción de H₂S (*C. perfringens* reduce el sulfito a sulfuro, forma sulfuro de hierro y da color negro a las colonias). La polimixina y la sulfadiazina son antibióticos que aportan especificidad al medio. Composición: *peptona de caseína* (15,50 g/L), *extracto de levadura* (10,00 g/L), *citrato férrico* (0,50 g/L), *sulfito sódico* (0,50 g/L), *sulfadiazina* (0,12 g/L), *polimixina B sulfato* (0,01 g/L), *agar* (13,00 g/L).
4. [Agar Levine \(Eosin Methylene Blue, EMB\)](#): Medio de cultivo sólido, específico y diferencial para el recuento de coliformes totales. Se utiliza en la investigación y diferenciación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de la lactosa. La eosina y el azul de metileno se encargan de inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas, además de actuar como indicadores de fermentación. La bacteria *E. coli* se diferencia del resto por crecer formando colonias verdes metálicas. Composición: *peptona* (10,00 g/L), *lactosa* (10,00 g/L), *fosfato dipotásico* (2,00 g/L), *eosina Y* (0,40 g/L), *azul de metileno* (0,065 g/L), *agar* (15,00 g/L).
5. [Agar R2A](#): Medio de cultivo sólido, específico para el recuento de microorganismos oligotrofos en aguas. Se trata de un medio pobre en nutrientes. El sulfato de magnesio y el fosfato de potasio se encargan de mantener la presión osmótica del medio. Además, contiene almidón, que actúa como desintoxicante; y piruvato de sodio, que incrementa la recuperación de estas células estresadas. Este medio incubado a bajas temperaturas y en periodos prolongados, induce la “resucitación” de los oligotrofos. Composición: *peptona proteosa* (0,50 g/L), *caseína hidrolizada* (0,50 g/L), *extracto de levadura* (0,50 g/L), *D (+) – glucosa* (0,50 g/L), *almidón* (0,50 g/L), *piruvato de sodio* (0,30 g/L), *dipotasio hidrógeno fosfato* (0,30 g/L), *sulfato de magnesio anhidro* (0,024 g/L), *agar* (15,0 g/L).

6. Agar Violeta Rojo Bilis y Glucosa (VRBG): Medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial utilizado en la detección y recuento de enterobacterias totales. El rojo neutro es un indicador de pH. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas. Composición: *peptona de gelatina (7,00 g/L), extracto de levadura (3,00 g/L), cloruro de sodio (5,0 g/L), glucosa (10,00 g/L), mezcla de sales biliares (1,50 g/L), rojo neutro (0,03 g/L), cristal violeta (0,002 g/L), agar (15,00 g/L)*.
7. Agar Tergitol: Medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial para el aislamiento de microorganismos coliformes. El heptadecisulfato de sodio (Tergitol 7) actúa inhibiendo la flora secundaria indeseable, la difusión de “swarming” característica del *Proteus*, y favorece la recuperación de coliformes. Contiene azul de bromotimol, indicador de pH que nos permite diferenciar entre las bacterias fermentadoras y no fermentadoras de la lactosa. Composición: *azul de bromotimol (0,025 g/L), extracto de levadura (3,00 g/L), lactosa (10,00 g/L), peptona especial (5,00 g/L), Tergitol 7 (0,10 g/L), agar (15,00 g/L)*.
8. Caldo MacConkey: Medio específico para bacterias gram negativas fermentadoras de lactosa. Contiene sales biliares y cristal violeta encargados de inhibir el crecimiento de la gran mayoría de bacterias gram positivas. El colorante rojo neutro actúa como indicador de fermentación. Composición: *bilis de buey (5,00 g/L), peptona (20,00 g/L), lactosa (10,00 g/L), púrpura de bromocresol (0,01 g/L)*.
9. Plate Count Agar (PCA): Medio de cultivo sólido utilizado para el recuento de aerobios mesófilos. No presenta ningún compuesto que haga que el medio sea selectivo y/o diferencial. Composición: *peptona de caseína (5,00 g/L), extracto de levadura (2,50 g/L), dextrosa (1,00 g/L), agar (15,00 g/L)*.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C durante 15 minutos antes de su utilización.

3.3. Inoculación y siembra en medios de cultivo

En el momento de recepción de las muestras, todas fueron almacenadas en nevera a 4 °C hasta el momento de su análisis que no fue más allá de 24 horas desde la recepción.

En primer lugar, se realizaron diluciones seriadas de las muestras de agua. Para ello, se utilizó Agua Peptonada (Extracto de carne 10 g/L y NaCl 5 g/L). Las diluciones se realizaron el mismo día en el que se sembraron las muestras, para que no se produjese un crecimiento bacteriano invalidándolas.

Todas las diluciones fueron llevadas a cabo en campana de flujo vertical, y utilizando pipetas y tubos estériles para mantener las condiciones de asepsia.

De la misma manera, la siembra en las placas se hizo en dicha campana y siempre con un mechero Bunsen encendido para asegurar la esterilidad del ambiente. Para realizar la inoculación, se añadió 0,1 mL de muestra en la placa Petri. Cada placa contiene unos 20 mL de medio de cultivo. Una vez añadida la muestra, se extendió de manera uniforme por todo el medio con un asa de Digralsky, previamente esterilizada con alcohol y a la llama del mechero. Tan sólo hay una excepción a ésta técnica y es el medio SPS, cuya inoculación fue en masa, es decir, se añaden los 0,1 mL de muestra en la placa, y a continuación se añaden 20 mL del medio previamente atemperado en un baño a 50 °C, con ligera agitación para que la muestra se extienda de manera adecuada.

3.4. Incubación en estufa

Tras la inoculación de las muestras, los medios de cultivo fueron incubados en distintas estufas dependiendo de las temperaturas necesarias para el crecimiento de los microorganismos tal y como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo, temperatura y tiempos de incubación utilizados para el análisis de cada grupo de microorganismos.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo de incubación
Hongos	Agar Sabouraud	25°C	7 días
Enterococos	Agar Slanetz-Bartley	37°C	48 horas
<i>C. perfringens</i>	Agar SPS	37°C	48 horas (anaerobiosis)
Oligotrofos de crecimiento lento	Agar R2A	20°C	7 días
Oligotrofos de crecimiento rápido	Agar R2A	32°C	48 horas
Aerobios mesófilos	Agar PCA	32°C	24 horas
Enterobacterias	Agar VRBG	37°C	24 horas
Coliformes totales	Agar Levine EMB	32°C	48 horas
Coliformes fecales	Agar Tergitol	45°C	24 horas

3.5. Análisis de contaminación fecal

Para llevar a cabo un examen más exhaustivo de la posible contaminación fecal presente en los limnoembalses, en el último muestreo (correspondiente a

la estación de invierno) se llevó a cabo una técnica conocida como colimetría presuntiva y posteriormente una colimetría confirmativa.

3.5.1. Colimetría presuntiva

Técnica que se utiliza para la detección de bacterias coliformes. Los coliformes son bacterias con morfología de bacilo o cocobacilo, gram negativas, presentes en el intestino y en las heces de humanos y animales. Se tratan de bacterias aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativa, que no tienen capacidad para esporular. Entre sus características más importantes se encuentra la capacidad de fermentar lactosa produciendo gas y ácido a 37 °C, lo que se produce en un tiempo máximo de 48 horas. Además, si estas bacterias son fecales, también producirán ácido y gas a 45 °C en un máximo de 24 horas. Estas propiedades nos permiten identificarlas, o al menos diferenciarlas de otras bacterias. A este grupo pertenecen bacterias del género *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Para realizar esta técnica se prepara una batería de tubos con medio caldo MacConkey. Por cada muestra se inoculan 9 tubos, a 3 concentraciones distintas:

- 3 Tubos de 9,9 mL de medio MacConkey, a los que se añade 0,1 mL de muestra.
- 3 Tubos de 9,0 mL de medio MacConkey, a los que se añade 1,0 mL de muestra.
- 3 Tubos de 10,0 mL de medio MacConkey doble concentrado, a los que se añade 10 mL de muestra.

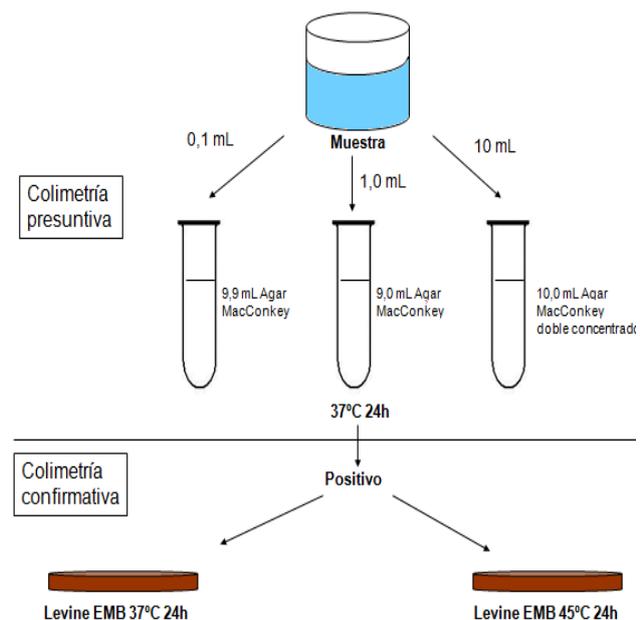


Figura 5. Esquema de la metodología de análisis de la Colimetría presuntiva/confirmativa.

Cada tubo estéril contiene en su interior una campana de Durham. La campana es utilizada para poder visualizar la producción de gas por parte de los

microorganismos. La presencia de coliformes se visualiza con la aparición de gas y el viraje del medio a color amarillo. Posteriormente, se realiza un recuento con la técnica estadística del Número Más Probable (NMP). En función de los datos que se obtienen, se realiza una segunda prueba, llamada colimetría confirmativa.

3.5.2. Colimetría confirmativa

Para valorar la contaminación fecal de los limnoembalses, lo que realmente nos interesa es confirmar la presencia de la bacteria *E. coli*. Para ello, se utiliza el medio Levine EMB, en el cual se inoculan las muestras positivas de la colimetría presuntiva, es decir, aquellos tubos que presentan color amarillo (debido a la fermentación de la lactosa) y producción de gas. Este medio se incubaba a 37 y 45 °C durante 24 h, al final de lo cual se busca la presencia de colonias verdes metálicas características, que serán indicativas de contaminación fecal.

3.6. Recuento de microorganismos

El recuento de microorganismos se realizó electrónicamente con un contador automático de colonias. El aparato se encarga de fotografiar las placas y hacer el recuento de colonias presentes en las mismas. A continuación, para calcular las unidades formadoras de colonias (UFC), se utilizó la siguiente ecuación:

$$N = C \times \frac{1}{i} \times \frac{1}{d}$$

Dónde N es el número de colonias viables por mL, C es el número de colonias contadas en la placa, i el inoculo empleado y d la dilución utilizada.

Cuando en una placa inoculada con la dilución más alta realizada de la muestra, aparecen más de 300 UFC el resultado se describe como “incontables”.

Todas las muestras se inocularon por duplicado, obteniéndose en todos los casos las medias que es el valor que se muestra en los resultados.

4. Resultados

A continuación, se muestran los resultados del análisis microbiológico en tablas ordenadas en función de las estaciones del año:

4.3. Primavera

Tabla 2. Resultados del análisis microbiológico de primavera, expresados en UFC/mL para hongos, *C. perfringens*, enterobacterias y oligotrofos, y ausencia/presencia (+/-) para coliformes totales.

	Coliformes totales	Hongos	Enterococos	<i>Clostridium perfringens</i>	Oligotrofos de crecimiento rápido	Enterobacterias
Limnoembalse El Vicario						
Punto de muestreo						
Presa 0 m	-	0	0	0	1,5 x 10 ³	6,9 x 10 ²
Presa 3m	-	0	0	0	2,2 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴
Presa 6 m	-	0	0	0	2,2 x 10 ³	8,4 x 10 ²
Zona Media 0 m	-	1,0 x 10 ¹	0	0	6,8 x 10 ⁴	2,3 x 10 ³
Zona Media 3 m	-	0	0	1,5 x 10 ²	1,2 x 10 ³	6,2 x 10 ²
Cola 0 m	-	0	0	1,0 x 10 ¹	4,4 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³
Río Bañuelos 0 m	-	0	0	1,0 x 10 ¹	9,0 x 10 ³	5,0 x 10 ²
Limnoembalse Presa Verde						
Punto de muestreo						
Presa 0 m	-	0	0	0	2,7 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴
Río Bullaque 0 m	+	0	0	2,0 x 10 ¹	1,8 x 10 ³	6,7 x 10 ²
Limnoembalse de Pareja						
Punto de muestreo						
Presa 0 m	-	0	0	0	NC	6,0 x 10 ¹
Presa 2 m	-	0	0	0	2,9 x 10 ²	3,0 x 10 ¹
Presa 5 m	-	0	0	0	NC	0
Presa 8 m	+	0	0	0	1,9 x 10 ⁴	1,1 x 10 ²
Cola 0 m	-	0	0	0	1,0 x 10 ³	4,2 x 10 ²
Río Ompólveda 0 m	-	0	0	0	6,7 x 10 ²	4,8 x 10 ²

NC: No contable. Crecimiento masivo.

4.4. Verano

Tabla 3. Resultados del análisis microbiológico de verano, expresados en UFC/mL para hongos, *C. perfringens*, enterobacterias, aerobios mesófilos y oligotrofos; y ausencia/presencia (+/-) para coliformes totales y coliformes fecales.

	Coliformes totales	Hongos	Coliformes fecales	Enterococos	<i>Clostridium perfringens</i>	Oligotrofos de crecimiento rápido	Enterobacterias	Aerobios mesófilos	Oligotrofos de crecimiento lento
Limnoembalse El Vicario									
Punto de muestreo									
Presa 0 m	-	0	-	0	0	$4,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
Presa 3 m	-	$1,0 \times 10$	-	0	$1,0 \times 10^1$	$4,6 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$
Presa 6 m	-	$3,0 \times 10^1$	-	0	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^4$	$9,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	**
Zona Media 0 m	-	$7,0 \times 10^1$	-	0	0	$6,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	**
Zona Media 3 m	-	0	-	0	$3,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$
Cola 0 m	+	0	+	0	0	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$
Río Bañuelos 0 m	+	$1,7 \times 10^2$	+	0	$1,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
Limnoembalse Presa Verde									
Punto de muestreo									
Presa 0 m	+	$3,0 \times 10^1$	+	0	$2,0 \times 10^1$	$4,7 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
Río Bullaque 0 m	+	$5,0 \times 10^1$	+	0	$1,0 \times 10^1$	$2,1 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4$
Limnoembalse de Pareja									
Punto de muestreo									
Presa 0 m	-	0	-	0	0	$1,1 \times 10^2$	0	0	**
Presa 2 m	-	0	-	0	0	$8,3 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$	$6,9 \times 10^2$
Presa 5 m	-	0	-	0	0	$7,9 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$
Presa 8 m	-	0	+	0	0	$9,9 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$
Cola 0 m	-	0	-	0	0	$6,2 \times 10^2$	0	0	$9,6 \times 10^2$
Río Ompólveda 0 m	+	$1,0 \times 10^1$	-	0	0	$3,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$

*Presencia de colonias verdes metálicas en el medio Levine EMB, indicadoras de la presencia de *E. Coli*.

**No se pudo hacer el recuento, pero había crecimiento.

4.5. Otoño

Tabla 4. Resultados del análisis microbiológico de otoño, expresados en UFC/mL para hongos, *C. perfringens*, enterobacterias, aerobios mesófilos y oligotrofos, y ausencia/presencia (+/-) para coliformes totales y coliformes fecales.

	Coliformes totales	Hongos	Coliformes fecales	Enterococos	<i>Clostridium perfringens</i>	Oligotrofos de crecimiento rápido	Enterobacterias	Aerobios mesófilos	Oligotrofos de crecimiento lento
Limnoembalse El Vicario									
Punto de muestreo									
Presa 0 m	-	3,0 x 10 ¹	0	0	0	1,8 x 10 ⁴	2,9 x 10 ²	7,6 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴
Presa 3 m	-	1,0 x 10 ¹	+	0	0	2,2 x 10 ⁴	7,0 x 10 ²	8,3 x 10 ³	1,6 x 10 ⁴
Presa 6 m	-	0	+	0	0	1,7 x 10 ⁴	1,0 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴
Zona Media 0 m	+	1,0 x 10 ¹	+	0	3,0 x 10 ¹	2,7 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	NC
Zona Media 3 m	No hay muestra								
Cola 0 m	-	2,0 x 10 ¹	0	0	1,0 x 10 ¹	6,0 x 10 ³	4,4 x 10 ²	1,4 x 10 ³	6,5 x 10 ³
Río Bañuelos 0 m	-	3,0 x 10 ¹	0	0	0	9,2 x 10 ³	4,7 x 10 ²	3,0 x 10 ³	1,3 x 10 ³
Limnoembalse Presa Verde									
Punto de muestreo									
Presa 0 m	No hay muestra								
Río Bullaque 0 m	No hay muestra								
Limnoembalse de Pareja									
Punto de muestreo									
Presa 0 m	-	0	0	0	0	1,8 x 10 ³	1,0 x 10 ¹	3,0 x 10 ¹	2,9 x 10 ³
Presa 2 m	-	2,0 x 10 ¹	0	0	0	4,1 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ²	7,5 x 10 ³
Presa 5 m	-	0	0	0	1,0 x 10 ¹	9,8 x 10 ³	3,0 x 10 ²	7,0 x 10 ²	1,0 x 10 ⁴
Presa 8 m	+	0	0	0	0	1,8 x 10 ⁴	1,5 x 10 ²	6,4 x 10 ²	4,4 x 10 ³
Cola 0 m	-	0	0	0	0	4,8 x 10 ³	2,8 x 10 ²	3,7 x 10 ²	3,0 x 10 ²
Río Ompólveda 0 m	-	0	0	0	0	1,3 x 10 ⁴	1,0 x 10 ¹	6,0 x 10 ¹	1,2 x 10 ⁴

NC: No contable. Crecimiento masivo.

4.6. Invierno

Tabla 5. Resultados del análisis microbiológico de invierno, expresados en UFC/mL.

	Hongos	Enterococos	<i>Clostridium perfringens</i>	Oligotrofos de crecimiento rápido	Aerobios mesófilos	Oligotrofos de crecimiento lento
Limnoembalse El Vicario						
Punto de muestreo						
Presa 0 m	0	0	0	8×10^2	8×10^1	6×10^2
Presa 3 m	0	0	0	$4,1 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$	$5,8 \times 10^3$
Presa 6 m	0	0	0	$4,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$
Zona Media 0 m	0	0	0	$1,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$
Zona Media 3 m	0	0	0	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$
Cola 0 m	0	0	0	NC	$1,3 \times 10^3$	NC
Río Bañuelos 0 m	5×10^1	0	3×10^1	NC	$4,7 \times 10^3$	NC
Limnoembalse Presa Verde						
Punto de muestreo						
Presa 0 m	No hay muestra					
Río Bullaque 0 m	No hay muestra					
Limnoembalse de Pareja						
Punto de muestreo						
Presa 0 m	1×10^1	0	0	$8,9 \times 10^2$	1×10^0	7×10^2
Presa 2 m	1×10^1	0	0	$7,1 \times 10^2$	0	$3,2 \times 10^3$
Presa 5 m	0	0	0	$4,9 \times 10^2$	0	$2,9 \times 10^3$
Presa 8 m	0	0	0	$1,7 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	$2,8 \times 10^3$
Cola 0 m	0	1×10^1	0	$8,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^3$
Río Ompólveda	1×10^1	2×10^1	0	$1,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	NC

NC: No contable. Crecimiento masivo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la muestra tomada en invierno también se llevó a cabo una colimetría presuntiva y una colimetría confirmativa

para aumentar la especificidad del estudio. Los resultados de esta técnica se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la colimetría presuntiva/confirmativa realizada en enero de 2016.

	Colimetría presuntiva						Colimetría confirmativa				
	Agar MacConkey						Levine EMB		NMP/100 mL		
	Tubos 10 mL		Tubos 9 mL		Tubo 9,9 mL		37°C	45°C			
Limnoembalse El Vicario											
Punto de muestreo											
Presa 0 m											0
Presa 3 m											0
Presa 6 m											0
Zona Media 0 m	++	++		++					+	+	15
Zona Media 3 m											0
Cola 0 m											0
Río Bañuelos 0 m	+	+	+	+	+		+		+	+	150
Limnoembalse Presa Verde											
Punto de muestreo											
Presa 0 m	No hay muestra										
Río Bullaque 0 m	No hay muestra										
Limnoembalse de Pareja											
Punto de muestreo											
Presa 0 m											0
Presa 2 m											0
Presa 5 m											0
Presa 8 m											0
Cola 0 m											0
Río Ompólveda	+	+		+			++		+	+	20

En la siguiente figura (Figura 6) se muestran los datos de los cambios en el recuento de los oligotrofos de crecimiento rápido y lento, así como el de

mesófilos aerobios y hongos durante el período de tiempo estudiado en los distintos limnoembalses analizados.

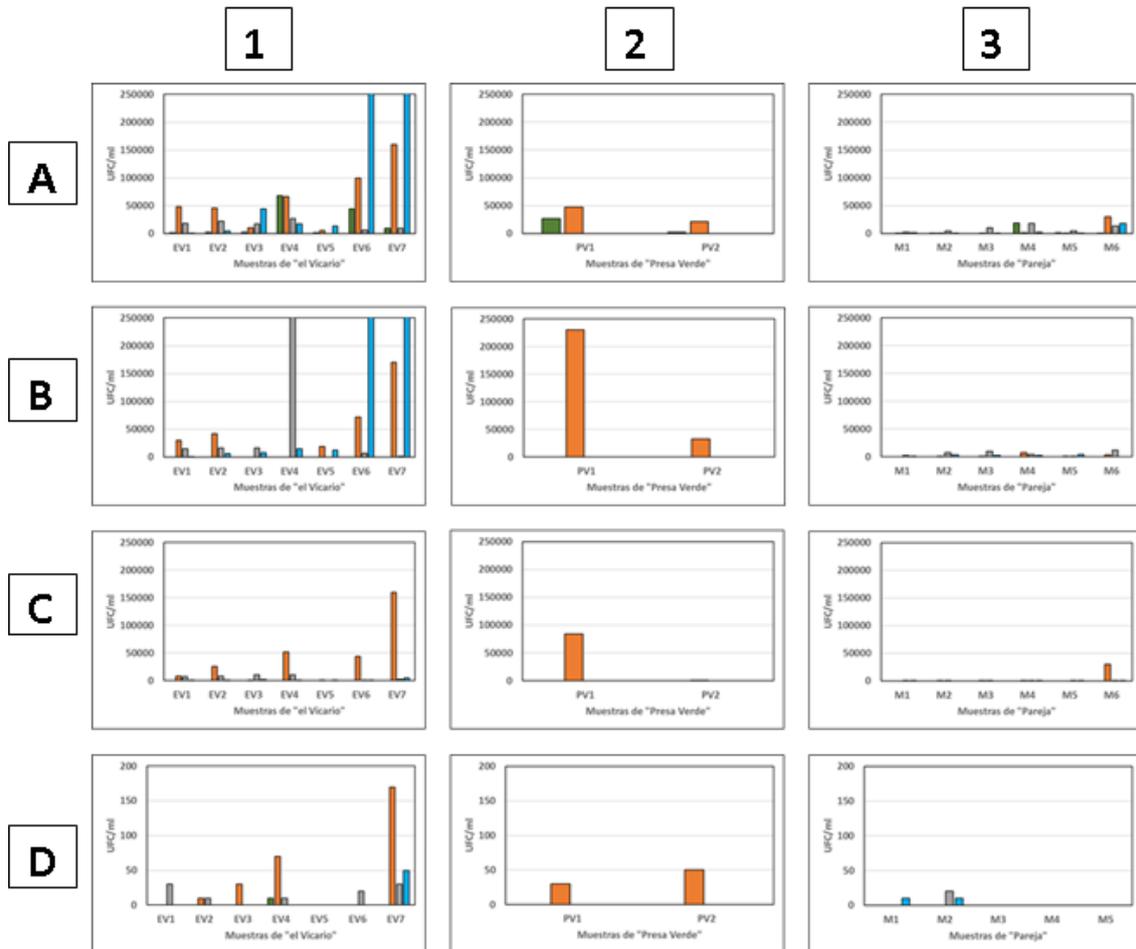


Figura 6. Recuento de oligotrofos de rápido crecimiento (A), de lento crecimiento (B), mesófilos aerobios (C) y hongos (D), en las presas de El Vicario (1), Presa Verde (2) y Pareja (3). Los datos se expresan en UFC/mL. ■ Primavera ■ Verano ■ Otoño ■ Invierno. El código usado para los puntos de muestreo en cada limnoembalse, se muestra en el listado de abreviaturas de esta memoria.

Como se puede observar, la mayor cantidad de microorganismos, independientemente del grupo de los mismos, se encontró en el limnoembalse de El Vicario. En los puntos muestreados, se puede comprobar que es la cola y el río Bañuelos donde el número de los mismos es más alto. Es el limnoembalse de Pareja donde se detectaron los valores más bajos de recuento de oligotrofos, tanto de crecimiento rápido como lento, así como de mesófilos aerobios y hongos.

5. Discusión

En primer lugar, cabe destacar que en las estaciones de otoño e invierno algunas de las muestras no se tomaron debido a la poca cantidad de agua que presentaba el punto de muestreo (Figuras 2, 3 y 4).

De la misma manera, los medios de cultivo utilizados fueron variando a medida que obteníamos resultados e información acerca del estado de los limnoembalses. En el muestreo de primavera se hizo un análisis más general, como toma de contacto con ellos. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de coliformes totales y enterobacterias, lo que nos hizo pensar que podía haber contaminación fecal en los limnoembalses. Por ello, en verano se introdujo el medio de cultivo Agar Tergitol, que es selectivo para coliformes fecales cuando es incubado a 45 °C durante 24 horas. A parte de este medio, en verano también comenzamos a utilizar el medio PCA, para valorar la cantidad de aerobios mesófilos presentes en las muestras de agua; y duplicamos el número de placas de R2A, cultivando la mitad de ellas a 20 °C durante 7 días para determinar los oligotrofos de crecimiento lento, y la otra mitad a 32 °C durante 48 horas para determinar los oligotrofos de crecimiento rápido. Estos 3 medios nos sirven para valorar la calidad ecológica de los limnoembalses.

La última modificación que se hizo, en cuanto a medios de cultivo se refiere, fue en las muestras de invierno. Los resultados que estábamos obteniendo hasta ese momento acerca de la contaminación fecal en las muestras analizadas, nos llevaron a cambiar la metodología de estudio e introducir la técnica de la colimetría presuntiva y confirmativa, que nos permitió aumentar la especificidad de los resultados y dar un recuento de coliformes totales y presencia de coliformes fecales.

5.1. Calidad ecológica

El objetivo principal de los estudios de calidad ecológica es la caracterización de las aguas conforme a la normativa de la Directiva Marco de Agua. Esta directiva nace el 22 de diciembre del 2000, a raíz de la necesidad de unificar las actuaciones llevadas a cabo respecto al agua en la Unión Europea (Anon.,

2016). Lo que se pretende conseguir con ella, es establecer unas condiciones de referencia para la protección de los sistemas acuáticos.

Estos protocolos de actuación se basan en indicadores biológicos que determinan la calidad ecológica de las aguas. Entre ellos se encuentran la determinación de microorganismos aerobios mesófilos y oligotrofos, que nos aportan información acerca de la cantidad de contaminantes orgánicos presentes en el ecosistema. Los oligotrofos son microorganismos autóctonos del agua capaces de crecer en medios muy pobres en nutrientes y a temperaturas bajas. Sin embargo, los aerobios mesófilos son microorganismos que aparecen mayoritariamente cuando el contenido en nutrientes es mayor. Observando la relación entre unos y otros microorganismos se puede saber el estado ecológico de la masa de agua analizada. El estado ideal es que haya un número elevado de oligotrofos y que el número de mesófilos aerobios sea muy bajo ya que se considera que, debido a la falta de nitrógeno y fósforo de las aguas, está limitado el crecimiento de los mismos (Molina Navarro, et al., 2011).

En la figura 6 podemos observar como la mayor cantidad de microorganismos se encuentran en la presa de El Vicario, siendo Pareja donde se encuentra el menor número. En el caso de la presa de El Vicario, los mayores valores se obtuvieron en la cola del limnoembalse (EV6) y en el río Bañuelos (EV7). Sin embargo, en el caso de la Presa Verde, los mayores valores se obtuvieron en el agua de la presa (PV1) y no en el río Bullaque (PV2) que es el que aporta el agua al mismo. En el caso de Pareja, de nuevo, los mayores valores se obtuvieron en aguas procedentes del río Ompólveda (M6). En ninguna de las presas analizadas el número de mesófilos aerobios fue mayor que los oligotrofos, por lo tanto, se puede señalar que el estado ecológico de las aguas de las tres presas es bueno. Además, para valorar la calidad ecológica de las aguas, también se ha analizado la presencia de hongos y levaduras. Los resultados muestran bajas concentraciones de estos microorganismos en el agua en los tres casos (En la figura 6, en el caso de estos microorganismos la escala de la gráfica es 1000 veces que en el caso de las bacterias).

5.2. Contaminación fecal

Para detectar la contaminación fecal que pudieran tener los tres limnoembalses, se analizó la presencia de diferentes grupos de microorganismos: enterobacterias, enterococos, *Clostridium perfringens* y coliformes, tanto totales como fecales.

Como era de esperar, la gran mayoría de las muestras analizadas tenían presencia de enterobacterias. Es lógico ya que dentro de este grupo de bacterias las hay que tienen su hábitat en el agua, sin ser necesariamente, por tanto, de origen fecal. Son los coliformes, junto con los enterococos y clostridios los que dan una idea más real de la presencia de contaminación fecal (García-Armisen and Servais, 2007).

En los análisis realizados en la presa de El Vicario, se detectaron en verano otoño e invierno coliformes totales en el río que le aporta el agua (Bañuelos), lo que puede deberse al aumento de estos microorganismos que se produce tras las lluvias, según algunos autores (Haggarty et al., 2010; Hong et al., 2010). Sin embargo, en los mismos períodos no se detectaron coliformes totales en las muestras de la zona próxima al dique. En todos los casos donde se habían detectado coliformes, cuando se hicieron las incubaciones a 45 °C se detectó crecimiento indicando, por tanto, que se trataba de contaminación fecal.

En la Presa Verde, se detectó contaminación por coliformes en las muestras de primavera y verano del río Bullaque, contaminación que en verano alcanzó la zona del dique de la presa. En todos los casos se demostró que era contaminación fecal. Al no tener muestras de otoño e invierno, por no haber agua, no se puede determinar contaminación.

Por último, en la presa de Pareja, solo se detectó presencia de coliformes en el río Ompólveda en las muestras de verano e invierno, en ambos casos también se trataba de coliformes fecales. La presencia de contaminación fecal en el río Ompólveda puede tener su origen en una nave muy cercana que puede estar vertiendo residuos en él. En otoño se detectó presencia de coliformes totales en la zona del dique a 8 metros de profundidad, pero no eran fecales. En invierno, en la zona media, en la superficie, se detectó coliformes totales que fueron fecales.

Tanto los limnoembalses como los ríos se conocen como aguas continentales. Si comparamos los valores del anexo I (referentes al Real Decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño) con los obtenidos en el cálculo del NMP en el análisis de contaminación fecal de invierno, podemos concluir que la calidad de las aguas de todos los limnoembalses estudiados y los ríos que la abastecen es excelente.

Otro grupo de microorganismos indicadores de contaminación fecal son los enterococos. Su análisis permite conocer si la contaminación fecal es humana o animal al establecer la relación N° coliformes (CF) /N° enterococos (SF) (Geldreich, et al., 2968) tal como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Determinación del origen de la contaminación fecal según la relación de CF/SF (Geldreich et al, 1968).

CF / SF	Origen de la contaminación fecal
>4	Fuerte evidencia de que la contaminación es de origen humano
2,0 – 4,0	Buena evidencia del predominio de residuos humanos
0,6 – 2,0	Buena evidencia del predominio de residuos animales
< 0,6	Fuerte evidencia de que la contaminación es de origen animal

Por esa razón se analizó su presencia en las muestras de los tres limnoembalses. Lo primero que nos llamó la atención al realizar el estudio fue el crecimiento nulo en todos los muestreos usando el medio Slanetz-Bartley, específico para enterococos. Para comprobar que el medio estaba bien preparado, y que no había crecimiento porque no había presencia de enterococos en ninguno de los limnoembalses, introdujimos un control positivo a 37 °C durante 24 horas en la estufa. El crecimiento fue bueno, por lo que se dedujo que en los limnoembalses y ríos analizados no había presencia de enterococos a excepción del río Ompólveda en las muestras de invierno.

Los resultados para *Clostridium perfringens* en el limnoembalse de Pareja fueron negativos en todos los muestreos, a excepción del otoño donde si obtuvimos crecimiento en una de las muestras. Sí que se halló presencia de este microorganismo, característico por su crecimiento en forma de colonias negras en el medio SPS, en el resto de limnoembalses. Todas las muestras tomadas del río Bullaque presentaron contaminación. Varias de las muestras del limnoembalse El Vicario dieron positivo en el análisis, aunque siempre en

bajas concentraciones, siendo el número de muestras positivas mucho menor en las muestras de otoño e invierno.

6. Conclusiones

Del trabajo realizado se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Las características ecológicas de los tres limnoembalses analizados son buenas ya que los mesófilos aerobios no son mayoritarios frente a los oligotrofos, presentando además un número reducido de hongos y levaduras.
2. Las aguas de los tres limnoembalses, atendiendo al número de coliformes fecales presentes y al Real Decreto 1341/2007, pueden ser consideradas excelentes para el baño.

7. Bibliografía

- Anon., 2012. Centros Para el Control y la Prevención de Enfermedades. Disponible en línea en: <https://www.cdc.gov/healthywater/swimming/rwi/rwi-how-esp.html> (Último acceso: 15 junio 2016).
- Anon., 2016. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en línea en: <http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/planificacion-hidrologica/marco-del-agua/default.aspx> (Último acceso: 26 junio 2016).
- Anon., 2016. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente. Disponible en línea en: <http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/seguridad-de-presas-y-embalses/desarrollo/> (Último acceso: 24 junio 2016).
- Anon., 2010. Organización Mundial de la Salud. Disponible en línea en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/> (Último acceso: 10 junio 2016).
- Fernández Crespo, J., Garcés Andreu, P., 2003. Guía de trabajo en el aula de para Educación Secundaria: "El agua, un recurso indispensable".

- Garcia-Armisen, T., Servais, P., 2007. Respective contributions of point and nonpoint sources of E. coli and enterococci in a large urbanized watershed (the Seine river, France). *Journal of Environmental Management*, 82 (4): 512-518.
- Geldreich, E. E., Best, L. C., Kenner, B. A., Van Donsel, D. J. 1968. The bacteriological aspects of stormwater pollution. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 40 (6): 1861-1872.
- Haggarty, R.A., Ferguson, C.A., Scott, E.M., Iroegbu, C., Stidson, R., 2010. Extreme value theory applied to the definition of bathing water quality discounting limits. *Water Research*, 44 (3): 719-728.
- Hong, H., Qiu, J., Liang, Y., 2010. Environmental factors influencing the distribution of total and fecal coliform bacteria in six water storage reservoirs in the Pearl River Delta Region, China. *Journal of Environmental Sciences*, 22 (5): 663-668.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P., 2009. *Brock Biología de los microorganismos*. Madrid: PEARSON EDUCACION S.A..
- Ministerio de la Presidencia, 26 de octubre de 2007. Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. *Boletín Oficial del Estado*, 257: 43620.
- Molina Navarro, E. et al., 2010. El limnoembalse de Cola de Pareja (Guadalajara): aspectos medioambientales e hidrológicos. *Boletín Geológico y Minero*, 121 (1): 69-80.
- Molina Navarro, E., Martínez Pérez, S., Sastre Merlín, A. 2008. Diseño y puesta a punto de un observatorio ambiental en torno al dique de Cola de Pareja (comarca de Sacedón, Guadalajara). *I Jornadas de Investigadores en Formación en Ciencias de la Tierra*. Madrid.
- Molina-Navarro, E., Martínez-Pérez, S., Sastre-Merlín, A., Soliveri, J., Fernández-Monistrol, I., Copa-Patiño, J.L, 2011. Microbiological water quality and its relation to nitrogen and phosphorus at the Pareja Limnoreservoir. (Guadalajara, Spain). *Journal of Environmental Management*, 92 (3): 773-779.

- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., 2009. Microbiología médica. Barcelona: ELSEVIER.
- Rodríguez Cabellos, J., 1995. Obras de corrección del impacto generado por el régimen de explotación. Confederación Hidrográfica del Guadiana, 6.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J., 2008. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Madrid: McGrawHill.

Listado de abreviaturas

Códigos usados en la Figura 6 para representar los puntos de muestreo en cada limnoembalse:

Limnoembalse El Vicario	
EV1	Presa 0 m
EV2	Presa 3 m
EV3	Presa 6 m
EV4	Zona Media 0 m
EV5	Zona Media 3 m
EV6	Cola 0 m
EV7	Río Bañuelos 0 m
Limnoembalse Presa Verde	
PV1	Presa 0 m
PV2	Río Bullaque 0 m
Limnoembalse de Pareja	
M1	Presa 0 m
M2	Presa 2 m
M3	Presa 5 m
M4	Presa 8 m
M5	Cola 0 m
M6	Río Ompólveda