



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la calidad microbiológica de hábitats lénticos de la provincia de Jaén.

Alumno: Sergio Berrio Moreno

Junio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la calidad microbiológica de hábitats lénticos de la provincia de Jaén.

Alumno: Sergio Berrio Moreno

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Sergio Berrio Moreno".

Junio, 2018

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	2
3.1 Contaminación fecal en aguas fluviales.....	2
3.2 Microorganismos contaminantes en aguas fecales.....	3
3.3 Análisis bacteriológicos del agua.....	6
3.4 Normativa española sobre calidad de las aguas potables.....	7
4. Objetivos.	11
5. Materiales y métodos.....	11
5.1 Localizaciones de muestreo escogidas.....	12
5.2 Material utilizado.	19
5.3 Metodología experimental.....	20
6. Resultados y discusión.....	31
6.1 Pruebas presuntivas.....	32
6.2 Pruebas Confirmativas.....	33
6.3 Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	33
6.4 Análisis estadístico basado en los resultados de NMP.....	35
6.5 Discusión de los resultados.....	40
7. Conclusiones.....	41
8. Bibliografía.	41
9. Links de páginas web utilizadas.	42

1. RESUMEN

En el presente trabajo, se ha determinado la presencia de coliformes totales y estreptococos fecales, en las muestras de agua de las localizaciones elegidas dentro de la provincia de Jaén. Se utilizaron 5 muestras de agua superficial que se obtuvieron de 2 ríos, 2 arroyos y una laguna. Dichas muestras se sembraron mediante el método del Número más probable (NMP) para determinar las coliformes totales (Colimetría), estreptococos fecales (Estreptometría) y *Staphylococcus* (Prueba de Catalasa).

2. ABSTRACT

In the present work, the presence of total coliforms and fecal streptococci has been determined in the water samples of the chosen locations within the province of Jaén. We used 5 samples of surface water that were obtained from 2 rivers, 2 streams and a lagoon. These samples were inoculated using the Most Probable Number (MPN) method to determine total coliforms (Colimetry), fecal streptococci (Streptometry) and Staphylococcus (Catalase test).

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Contaminación fecal en aguas fluviales

El agua puede presentarse como un agente transmisor de diversos microorganismos patógenos para el hombre. La mayoría de estos microorganismos viven en el tracto intestinal humano, y pasan al agua cuando ésta sufre contaminación fecal. El contacto directo con aguas contaminadas (ingestión, baño, etc.) puede provocar infecciones de diverso tipo.

La transmisión por el agua de consumo es sólo uno de los vehículos de transmisión de los agentes patógenos transmitidos por la vía fecal-oral. Pueden ser también vehículo de transmisión los alimentos contaminados, las manos, los utensilios y la ropa, sobre todo cuando el saneamiento e higiene domésticos son deficientes. Para reducir la transmisión de enfermedades por la vía fecal-oral es importante mejorar la calidad del agua y su disponibilidad, así como los sistemas de eliminación de excrementos y la higiene general (OMS, 2006).

El mayor riesgo microbiano del agua es el relacionado con el consumo de agua contaminada con excrementos humanos o animales, aunque puede haber otras fuentes y vías de exposición significativas (OMS, 2006).

3.2 Microorganismos contaminantes en aguas fecales

A continuación se describen los principales géneros patógenos asociados a aguas con aportes fecales, clasificados básicamente en 2 grandes grupos: enterobacterias lactosa-positivas (Coliformes totales) y estreptococos fecales. Además de los géneros de bacterias que aparecen en estos grupos también añadimos el género *Staphylococcus* que detectamos mediante la prueba de la Catalasa.

3.2.1 *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas (Coliformes totales)

Las enterobacterias lactosa-positivas o grupo coli-aerogenes constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37° C. Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados.

Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: suelo, plantas, cáscara de huevo, etc. Aunque su especificidad como indicadores no es buena, se suelen usar como índice de contaminación fecal por: Su frecuencia en heces, su fácil detección en el laboratorio y sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Dentro de este grupo, son los coliformes fecales los que tienen significado sanitario. Se considera a los coliformes fecales como presuntos *Escherichia coli*. Del grupo «Coliformes» forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. (María del Rosario Pascual Anderson y Vicente Calderón y Pascual, 1992)

ESCHERICHIA

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un

microorganismo de normal de la microbiota, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Guadalupe Rodríguez-Angeles, 2002)

Escherichia coli está presente en grandes concentraciones en la microbiota intestinal normal de las personas y los animales donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en otras partes del cuerpo *E. coli* puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis. Un número reducido de cepas enteropatógenas pueden causar diarrea aguda. Se han determinado varios tipos de *E. coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Se cuenta con más información sobre los primeros cuatro tipos mencionados, pero se conocen peor la patogenicidad y la prevalencia de cepas de ECEA y ECAD (OMS, 2006).

3.2.2 Enterococcus y Streptococcus (Estreptococos fecales)*

El grupo de los estreptococos fecales está formado por microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. cecorum*) y especies del género *Streptococcus*: *S. bovis*, *S. equinus*, *S. hyointestinalis*, *S. intestinalis*, *S. alactolyticus*, y *S. acidominin*. Son cocos Gram+, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa negativa.

ENTEROCOCCUS

Los *Enterococcus* son células esféricas u ovoides, de tamaño 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm. Son cocos grampositivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles, con excepción de las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo.

Las bacterias de este género habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, incluyendo al hombre. Pueden encontrarse

también en el tracto genitourinario y en la saliva. Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterocócicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central (aunque son raras), intrabdominal y pélvica.

Pueden adaptarse a vivir en los ambientes más hostiles, incluso en presencia de niveles letales de sales biliares y detergentes, tales como el dodecilsulfato sódico. Esta habilidad de *Enterococcus* para adaptarse y persistir en presencia de detergentes podría permitirles sobrevivir regímenes de limpieza inadecuados.

Existen 33 especies pertenecientes al género *Enterococcus*, algunas de estas especies poseen hospederos específicos. En los humanos, las especies más frecuentes son *E. faecalis* y *E. faecium* pues causan, entre ambos, aproximadamente el 90 % de los aislamientos clínicos. Otras especies como *E. gallinarum*, *E. raffinossus*, *E. casseliflavus* y *E. avium* se aíslan en menor proporción (Marilyn Díaz Pérez, Claudio Rodríguez Martínez y Raisa Zhurbenko, 2010)

STREPTOCOCCUS

Dentro del grupo de cocos grampositivos, según clasificación de Bergey (9^a edición, 1984), se encuentra el género *Streptococcus*. Los miembros de este género se caracterizan por su forma cocoide y por su agrupación en parejas o en cadenas. Son, generalmente, inmóviles, no esporulados, grampositivos y catalasanegativos, microaerófilos o anaerobios facultativos.

De acuerdo con el esquema de Lancefield, se agrupan antigénicamente mediante las letras A, B, C, D, etc. Al grupo D de Lancefield pertenecen los estreptococos fecales, por ser su hábitat normal el tubo digestivo de animales de sangre caliente. Entre sus características peculiares, está el poder crecer a temperatura de 45 °C y en medios con 4 por 100 de bilis.

Dentro de los estreptococos fecales, están los enterococos (*Streptococcus faecalis* y sus variedades *Str. faecium* y *Str. durans*) que viven generalmente en

el intestino humano. Otros estreptococos fecales viven en los animales (*Str. equi* y *Str. bovis*).

Los estreptococos son considerados indicadores de contaminación fecal y su presencia en los alimentos indica falta de higiene y su utilización como índice de contaminación fecal del agua viene siendo habitual desde hace tiempo (María del Rosario Pascual Anderson y Vicente Calderón y Pascual, 1992)

3.2.3 Staphylococcus

Staphylococcus aureus es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas de 0,8-1 μm de diámetro, que se dividen en más de un plano, por lo que se agrupan irregularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporas. Son grampositivas.

Es una especie muy sensible a la acción del calor y de los desinfectantes. Su presencia o la de sus toxinas en los alimentos es signo evidente de falta de higiene.

Una característica muy importante de este germen es que sus toxinas pueden ser causa de intoxicación cuando se ingieren. Si, además, *los St. aureus* aislados son cepas enterotoxigénicas, suponen un riesgo para la salud (María del Rosario Pascual Anderson y Vicente Calderón y Pascual, 1992)

3.3 Análisis bacteriológicos del agua

El objetivo de los análisis bacteriológicos del agua es determinar si ésta contiene microorganismos fecales, no necesariamente patógenos pero sí indicativos de que ha habido contaminación de origen animal o humano.

Para la correcta determinación de los criterios que determinan la calidad de agua aceptable, es conveniente establecer una lista bacteriológica, es decir, un listado de bacterias que no se deban encontrar en un agua destinada al consumo, e incluso la cantidad límite tolerada de estos organismos en el agua.

Los análisis microbiológicos se basan en la búsqueda de bacterias que se consideran indicadores de contaminación fecal, escogidas por estar presentes en muchas de las heces de animales de sangre caliente y ser origen frecuente

de contaminaciones bastante graves, ser fácilmente detectables y no desarrollarse en aguas puras.

El indicador más utilizado es la presencia de coliformes termotolerantes (bacterias del mismo género que *E. coli*), que continúa usándose con normalidad. Las aguas potables no deben tenerlas, por lo que es un buen indicador de potabilidad. Al anterior añadimos otros indicadores, como la presencia de estreptococos.

3.4 Normativa española sobre calidad de las aguas potables.

Para determinar si la calidad de las aguas analizadas entra dentro de los parámetros legales establecidos tomaremos en cuenta la legislación vigente que se centre en este ámbito como el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.

Este real decreto tiene por objeto establecer el régimen jurídico para la reutilización de las aguas depuradas, de acuerdo con el artículo 109.1 del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio.

3.4.1 Artículo 5. Criterios de calidad

1. Las aguas regeneradas deben cumplir en el punto de entrega los criterios de calidad según usos establecidos en el anexo I.A. Si un agua regenerada está destinada a varios usos serán de aplicación los valores más exigentes de los usos previstos.
2. Los organismos de cuenca, en las resoluciones por las que otorguen las concesiones o autorizaciones de reutilización, podrán fijar valores para otros parámetros o contaminantes que puedan estar presentes en el agua regenerada o lo prevea la normativa sectorial de aplicación al uso previsto para la reutilización. Asimismo, podrán fijar niveles de calidad más estrictos de forma motivada.

3. La calidad de las aguas regeneradas se considerará adecuada a las exigencias de este real decreto si el resultado del control analítico realizado de acuerdo con lo previsto en el anexo I.B cumple con los requisitos establecidos con el anexo I.C

4. El titular de la concesión o autorización de reutilización de aguas es responsable de la calidad del agua regenerada y de su control desde el momento en que las aguas depuradas entran en el sistema de reutilización hasta el punto de entrega de las aguas regeneradas.

5. El usuario del agua regenerada es responsable de evitar el deterioro de su calidad desde el punto de entrega del agua regenerada hasta los lugares de uso.

6. Las responsabilidades previstas en los apartados 4 y 5 se entenderán sin perjuicio de la potestad de supervisión y control de las autoridades ambientales y sanitarias.

7. La concesión de reutilización podrá ser modificada como consecuencia de las variaciones o modificaciones que se aprueben respecto de la concesión otorgada para el uso privativo del agua al primer usuario de la misma.

3.4.2 ANEXO I.A

En este anexo esta normativa establece el Valor Máximo Admisible (VMA) que se puede encontrar en aguas regeneradas para niveles de nematodos intestinales, *Escherichia coli*, sólidos en suspensión, turbidez y otros contaminantes. El VMA establecido varía según el uso que se le vaya a dar al agua. Debido a la naturaleza de este proyecto solo podremos demostrar la presencia *Escherichia coli* pero no determinar su valor en UFC/100ml.

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA) DE E.COLI
CALIDAD 1.1: RESIDENCIAL	0 (UFC/100 mL)
a) Riego de jardines privados.	
b) Descarga de aparatos sanitarios.	
CALIDAD 1.2: SERVICIOS	200 (UFC/100 mL)
a) Riego de zonas verdes urbanas	
b) Baldeo de calles.	
c) Sistemas contra incendios.	
d) Lavado industrial de vehículos.	

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA) DE E.COLI
CALIDAD 2.12 a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco.	100 (UFC/100 mL)
CALIDAD 2.2 a) Riego de productos para consumo humano con sistema de aplicación de agua que no evita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles, pero el consumo no es en fresco sino con un tratamiento industrial posterior. b) Riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne. c) Acuicultura.	1000 (UFC/100 mL)
CALIDAD 2.3 a) Riego localizado de cultivos leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación humana. b) Riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones. c) Riego de cultivos industriales no alimentarios, viveros, forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas.	10000 (UFC/100 mL)

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA) DE E.COLI
CALIDAD 3.1	10000 (UFC/100 mL)
a) Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria.	
b) Otros usos industriales.	
c) Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria	1000 (UFC/100 mL)
CALIDAD 3.2	Ausencia (UFC/100 mL)
a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.	
USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA) DE E.COLI
CALIDAD 4.1	200 (UFC/100 mL)
a) Riego de campos de golf.	
CALIDAD 4.2	10000 (UFC/100 mL)
a) Estanques, masas de agua y caudales circulantes ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua.	
USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA) DE E.COLI
CALIDAD 5.1	1000 (UFC/100 mL)
a) Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno.	
CALIDAD 5.2	0 (UFC/100 mL)
a) Recarga de acuíferos por inyección directa,	
CALIDAD 5.3	No se fija límite
a) Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público.	
b) Silvicultura	
CALIDAD 5.4	La calidad mínima requerida se estudiará caso por caso
a) Otros usos ambientales (mantenimiento de humedales, caudales mínimos y similares).	

4. OBJETIVOS

- Evaluar la presencia de microorganismos fecales en muestras de agua fluvial.
- Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados.
- Evaluar la influencia de la zona de muestreo en la cantidad y diversidad de microorganismos aislados.
- Determinar la variabilidad de los resultados obtenidos en muestras procedentes de distintas fechas.
- Aproximar, en base a los resultados, la calidad de las muestras de agua tomadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de este experimento es el análisis microbiológico de cinco muestras de agua dulce superficial para detectar la presencia de estreptococos y coliformes fecales. Para este proyecto he tomado 5 muestras de agua dulce en 5 localizaciones distintas dentro de la provincia de Jaén. La toma de muestras se realizó usando frascos de plástico de 100ml de capacidad como el que aparece en la figura 2, el recipiente se sumergió en dirección opuesta al flujo del recurso hídrico.



(Fig.1 Recogida de muestra en el río Guadalbullón)



(Fig.2 Tipo de recipiente usado para toma de muestras)

Cada frasco lleva anotado en una etiqueta la fecha y la hora exacta en que se tomó la muestra, además se anotó en un bloc de notas la siguiente información:

- Localización geográfica (coordenadas)
- Distancia a la orilla del punto de muestreo
- Profundidad del punto de muestreo
- Condiciones meteorológicas

Los recipientes con las muestras se guardaron en un frigorífico a temperatura adecuada para su preservación, y así retardar los cambios químicos y biológicos que continúan después de que la muestra se retira de su fuente. Las muestras fueron analizadas entre 1-2 días posteriores a su recogida, para garantizar que los resultados analíticos fueran más exactos.

Para el análisis microbiológico de las muestras de agua se han utilizado cuatro tipos de medios de cultivos: MacConkey Agar, Rothe agar, EMB Agar y KAA Agar.

5.1 Localizaciones de muestreo escogidas

Las muestras fueron obtenidas en cinco localizaciones distintas: Laguna de Almenara, Río Guadalbullón, Arroyo del Salado, Río Guadalquivir y Arroyo de las Particiones.

5.1.1 Breve descripción de las zonas de muestreo

Laguna de Almenara



(Fig.3 Localización laguna de Almenara. Fuente: Google Maps)

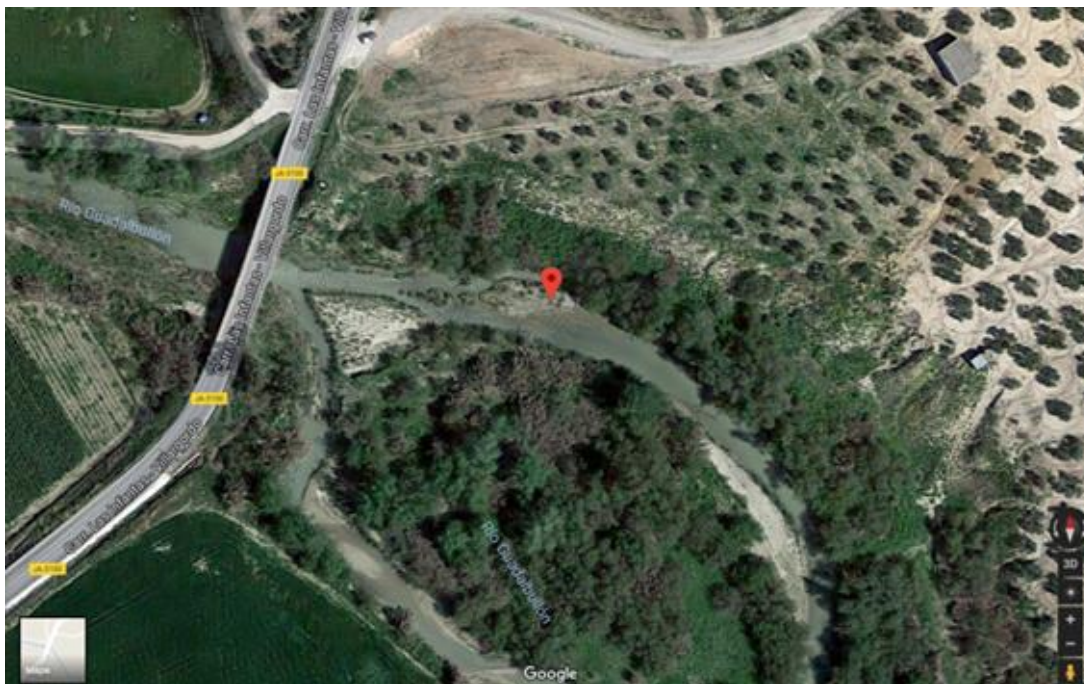
La primera zona de muestreo se encuentra en Almenara, una aldea situada en el término municipal de Jaén, a unos 13 km al norte de la ciudad, y a unos 5 km al sureste de Las Infantas. La cortijada se extiende por 12 ha, ocupando toda la cima de un cerro de 440 metros sobre el nivel del mar. Algunos arroyuelos, de curso muy embarrancado, nacen de sus cimas, como el Arroyo de los Gámez o el del Hueco.

El cerro de Almenara, que se alza a tres kilómetros al este del Río Guadalbullón, forma parte de las estribaciones más septentrionales del sistema de elevaciones que bordean su margen derecha a lo largo de todo su curso bajo, integrándose también en él, el Cerro de Alzapiernas, o las Lomas de Terrace, alcanzándose las mayores alturas en estas últimas (480 metros sobre el nivel del mar) (redjaen.es)

Aunque actualmente sólo algunos de los cortijos que la componen siguen estando habitados, encontrándose los demás en diferente estado de abandono y ruina, todo el conjunto se extiende por una superficie que supera las doce

hectáreas de extensión, lo que provoca que se sigan encontrando restos biológicos de animales (cadáveres y heces) que pueden converger por escorrentía superficial hacia la laguna de origen manantial donde se llevó a cabo el muestreo.

Río Guadalbullón



(Fig.4 Punto muestreado del Río Guadalbullón. Fuente: Google Maps)

Es un afluente del río Guadalquivir que discurre por la provincia de Jaén con un caudal anual medio de $150 \text{ Hm}^3/\text{año}$. Este río tiene caudales de estiaje que históricamente han permitido el establecimiento de riegos, ubicados inicialmente en el tramo bajo próximo a la unión con el Guadalquivir.

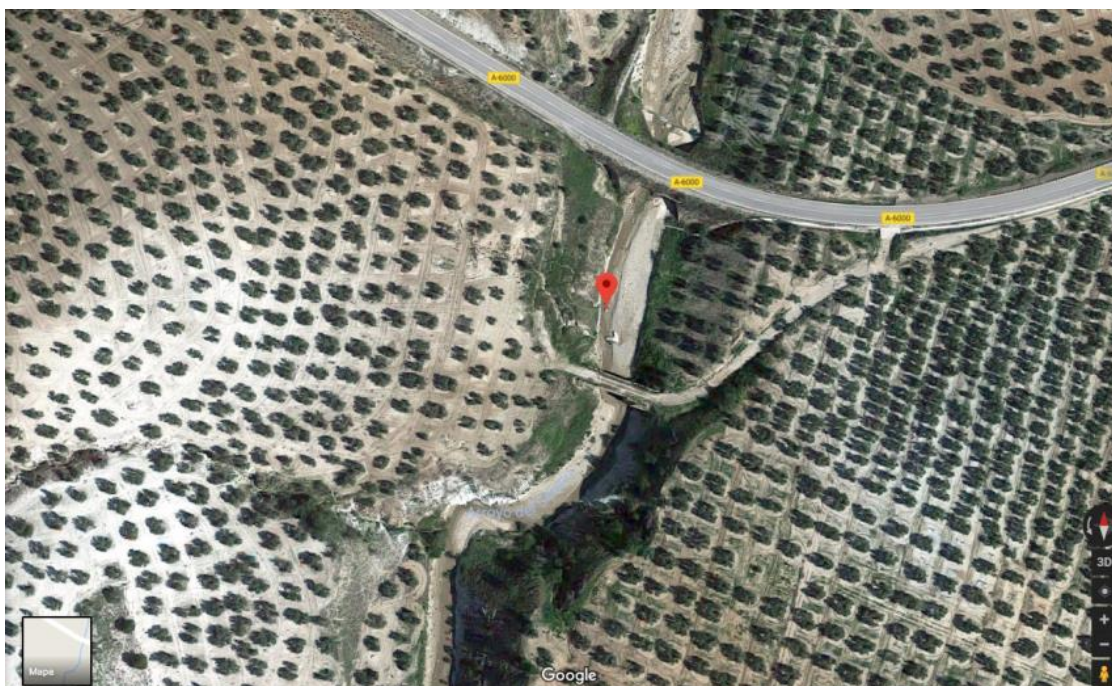
Desde el nacimiento hasta el paso por las cercanías de la ciudad de Jaén, el Guadalbullón presenta una calidad ambiental baja, cualidad que se ve reflejada en el Plan Director de Riberas de Andalucía. Especial significado tiene el entorno de Jaén, ya que es aquí donde se alcanzan los valores más bajos de calidad ambiental (pésima), calificación que se explica fundamentalmente por la fuerte presión urbanística a la que se ve sometido el río en este tramo.

El tramo que le sigue aguas abajo, hasta la desembocadura en el Guadalquivir, sigue presentando una destacada fragilidad. La mejora de la calidad ambiental de las riberas es la cualidad principal que distingue a este tramo del anterior.

Sólo en las proximidades de la desembocadura, en el término municipal de Mengíbar, aparece una fuerte presión urbanística, originada por la concentración de numerosas urbanizaciones en el entorno fluvial del Guadalbullón (paisajeyterritorio.es).

El tramo escogido para tomar la muestra se encuentra en la carretera JA-310, entre las localidades de Las infantas y Villargordo.

Arroyo del Salado



(Fig.5 Punto muestreado del Arroyo del Salado. Fuente: Google Maps)

Es un arroyo de bajo caudal que discurre desde el norte de la localidad de Mancha Real hacia el norte hasta su desembocadura en el río Guadalquivir cerca de la localidad de Vados de Torralba. Tiene como afluentes al Arroyo Frío, Arroyo de las Salinas, Arroyo del Brujuelo, Arroyo de la Manga y el arroyo del Pilar.

Las fuentes de contaminación antropogénicas de este curso fluvial son provocadas principalmente por los cultivos circundantes (olivo mayoritariamente) y por aguas residuales sin tratar de pequeños núcleos de población circundantes.

El tramo escogido para tomar la muestra se encuentra en la carretera A-6000, entre las localidades de Villargordo y Torrequebradilla.

Río Guadalquivir



(Fig.6 Punto muestreado del Río Guadalquivir. Fuente: Google Maps)

Es el mayor río de Andalucía. Su cuenca hidrográfica abarca territorios de las provincias de Almería, Jaén, Córdoba, Sevilla, Huelva, Cádiz, Málaga, Granada, Murcia, Albacete, Ciudad Real y Badajoz. Su nacimiento se ha situado en la sierra de Cazorla.

Las fuentes de contaminación antropogénicas de este curso fluvial tienen diverso origen y van desde los cultivos de las zonas que rodean la cuenca del río, pasando por los vertidos de origen industrial y los vertidos de aguas residuales de las distintas localidades cercanas al tramo elegido para tomar la muestra.

El tramo escogido para tomar la muestra se encuentra en la carretera JA-3101, entre las localidades de Vados de Torralba y Campillo del Río.

Arroyo de las Particiones



(Fig.7 Punto muestreado del Arroyo de las Particiones. Fuente: Google Maps)

Es un arroyo de caudal bajo e intermitente que cuyo nacimiento se puede situar aproximadamente en una zona situada al este de la carretera JF-3021 en el tramo que localidades de Torrequebradilla y Vados de Torralba, el curso de este arroyo discurre hacia el norte hasta su desembocadura en el río Guadalquivir cerca de la localidad de Vados de Torralba y de Sotogordo. Tiene como afluentes al Arroyo de los Pozones, Arroyo de los Hoyos de Pillido, Arroyo del Cañaveral, Arroyo Esparragoso y el arroyo del Pilar.

Las fuentes de contaminación antropogénicas de este curso fluvial son provocadas principalmente por los cultivos circundantes (árboles frutales, pequeños huertos y olivares mayoritariamente), no hay datos de vertidos de aguas residuales a este arroyo.

El tramo escogido para tomar la muestra se encuentra en la carretera JF-3021, entre las localidades de Vados de Torralba y Sotogordo.

5.1.2 Datos de las muestras recogidas

	ALMENARA		
	Día 1	Día 2	Día 3
Coordenadas	37°54'01.8"N 3°44'22.1"W		
Fecha de muestreo	03/02/2018	18/02/2018	03/03/2018
Hora de muestreo	16:05	10:30	16:03
Distancia a orilla (cm)	50		
Profundidad (cm)	10		
Temperatura (°C)	14	16	12
Precipitaciones (mm/día)	0	0	

	RÍO GUADALBULLÓN		
	Día 1	Día 2	Día 3
Coordenadas	37°55'00.6"N 3°46'38.6"W		
Fecha de muestreo	03/02/2018	18/02/2018	03/03/2018
Hora de muestreo	16:17	10:43	16:20
Distancia a orilla (cm)	70		
Profundidad (cm)	10		
Temperatura (°C)	14	16	12
Precipitaciones (mm/día)	0	0	

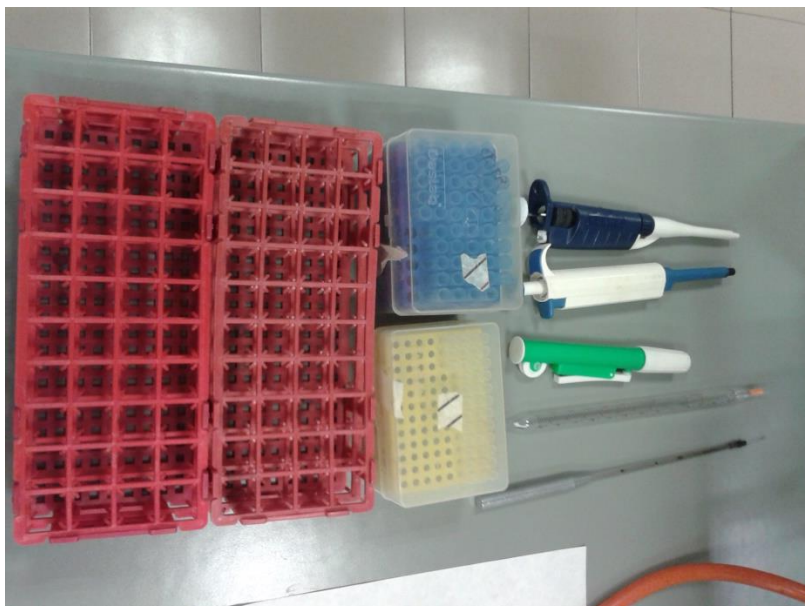
	ARROYO DEL SALADO		
	Día 1	Día 2	Día 3
Coordenadas	37°54'27.1"N 3°40'24.9"W		
Fecha de muestreo	03/02/2018	18/02/2018	03/03/2018
Hora de muestreo	16:42	11:09	16:46
Distancia a orilla (cm)	50		
Profundidad (cm)	10		
Temperatura (°C)	14	16	11
Precipitaciones (mm/día)	0	0	

	RÍO GUADALQUIVIR		
	Día 1	Día 2	Día 3
Coordenadas	37°56'42.0"N 3°38'47.7"W		
Fecha de muestreo	03/02/2018	18/02/2018	03/03/2018
Hora de muestreo	17:09	11:36	17:15
Distancia a orilla (cm)	120		
Profundidad (cm)	10		

Temperatura (°C)	14	16	10
Precipitaciones (mm/día)	0	0	

	ARROYO DE LAS PARTICIONES		
	Día 1	Día 2	Día 3
Coordenadas	37°56'47.3"N 3°37'13.8"W		
Fecha de muestreo	03/02/2018	18/02/2018	03/03/2018
Hora de muestreo	17:14	11:42	17:21
Distancia a orilla (cm)	50		
Profundidad (cm)	10		
Temperatura (°C)	14	16	10
Precipitaciones (mm/día)	0	0	

5.2 Material utilizado:



(Fig.8 Ejemplo de algunos materiales utilizados)

5.2.1 Material fungible

- Cuatro tipos distintos de medios de cultivo: MacConkey Agar, Rothe, EMB y KAA Agar.
- Agua destilada
- Tubos de ensayo
- Placas de Petri
- Puntas de pipetas

- Portaobjetos de vidrio (75mm x 25mm)
- Guantes
- Agua oxigenada (H_2O_2)

5.2.2 Material de laboratorio

- Asas de siembra
- Mechero Bunsen
- Micropipetas
- Pipetas Mohr (10ml)
- Probeta
- Matraces de Erlenmeyer (500ml)
- Vasos de precipitado (500ml)
- Gradillas
- Balanza analítica
- Autoclave
- Agitador-Mezclador Vortex
- Refrigerador de Laboratorio
- Estufa de Cultivo Microbiológico

5.3 Metodología experimental

Los principales grupos de microorganismos indicadores empleados son los coliformes y los estreptococos fecales. Para su determinación he usado una siembra basada en el Método del número más probable (NMP).

5.3.1 Medios de cultivo

Caldo MacConkey

Es un medio de cultivo selectivo, utilizado para la investigación presuntiva de microorganismos coliformes en aguas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Se trata de una modificación de la fórmula original dada por MacConkey, en la que se ha sustituido el taurocolato sódico por la bilis fresca de buey y el

tornasol por el púrpura de bromocresol. En una primera fase se intentó sustituirlo por el rojo neutro, pero los efectos inhibitorios no deseados aconsejaron el empleo del segundo. La fórmula corresponde a las recomendaciones de la Ph. Eur.

La presencia de la bilis fresca de buey en el medio inhibe el crecimiento de los microorganismos Gram-positivos. A su vez los gérmenes capaces de fermentar la lactosa acidularán el medio con el consiguiente cambio de color a amarillo y se observará la producción de gas en la campana de Durham. Para la técnica de NMP se darán como tubos positivos, aquellos que presenten turbidez, viraje a amarillo y gas en la campana de Durham.

(Panreac Química S.A, 2013)

Composición (g/l):

- Bilis de Buey..... 5,0
- Lactosa.....10,0
- Peptona de Gelatina..... 20,0
- Púrpura de Bromocresol.....0,01

pH: 7,3±0,2

Caldo Rothe

Es un medio de cultivo que se emplea para la investigación y recuento de enterococos en aguas y productos alimenticios.

La formulación de este medio se debe a Rothe y ha sido recomendado por otros investigadores para el recuento de enterococos en muestras de interés sanitario siguiendo el método del número más probable (NMP). Este medio corresponde a las recomendaciones de APHA para análisis de aguas.

La presencia de polipeptona y glucosa aporta los elementos nutritivos y energéticos del medio. La azida sódica inhibe el crecimiento de los microorganismos Gramnegativos y no afecta el crecimiento de los enterococos. El cloruro sódico mantiene el nivel salino necesario para el buen crecimiento de estos gérmenes. Los enterococos (*E. faecalis*, *S. durans*, *S. bovis* y *S. equinus*) son indicadores de contaminación fecal aun cuando no hay coliformes en la

muestra (los coliformes menos resistentes pueden haber desaparecido). El crecimiento de microorganismos en el medio se aprecia por la turbidez que aparece en este.

(Panreac Química S.A, 2013)

Composición (g/l):

- Sodio Azida..... 0,2
- D(+)-Glucosa..... 7,5
- Extracto de Carne..... 4,5
- Mezcla de Peptonas..... 15,0
- Sodio Cloruro..... 7,5

pH: 7,2±0,2

EMB Agar

Es un medio de cultivo que se emplea como medio diferencial para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas Gram-negativas.

Los primeros en desarrollar este medio fueron Holt-Harris y Teague, que a partir de la mezcla de azul de metileno y eosina consiguieron un efecto diferenciador muy claro entre las bacterias capaces de fermentar la lactosa y las que no lo eran. La inclusión de la sacarosa fue propiciada para aquellos microorganismos que fermentan con dificultad la lactosa, y fácilmente la sacarosa.

Por la combinación de estos dos colorantes y los dos hidratos de carbono se pueden distinguir algunos géneros. Las bacterias lactosa-negativas y sacarosa negativas (*Salmonella* y *Shigella*) dan colonias incoloras, mientras que las lactosa y/o sacarosa-positivas dan colonias púrpura-violeta negruzco con/sin un centro oscuro y quedan rodeadas de una zona incolora. Por el efecto de estos mismos colorantes también queda inhibido el crecimiento de la microbiota acompañante, sobre todo la Gram-positiva. También es posible la identificación de *Candida albicans*.

(Panreac Química S.A, (2013)

Composición (g/l):

- Eosina Amarillenta..... 0,4
- Lactosa..... 5,0
- di-Potasio Hidrógeno Fosfato..... 2,0
- Agar..... 13,5
- Azul de Metileno.....0,065
- Peptona Bacteriológica.....10,0
- Sacarosa.....5,0

pH: 7,2±0,2

KAA Agar

Es un medio de cultivo que se emplea como medio diferencial para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas Gram-negativas.

Este medio de cultivo se usa para confirmar la existencia de enterococos. El sulfato de kanamicina y la azida sódica inhiben el crecimiento de las demás bacterias. Estos microorganismos hidrolizan la esculina con la producción de glucosa y esculetina, la cual reacciona con el citrato de amonio férrico para dar un rango de color que puede variar entre el verde y el negro.

Composición (g/l):

- Triptona..... 20
- Extracto de levadura..... 5
- Cloruro sódico..... 5
- Citrato sódico..... 1
- Esculina..... 1
- Citrato férrico amónico..... 0,5
- Azida sódica..... 0,15
- Sulfato de kanamicina..... 0,02
- Agar..... 15

pH: 7,2±0,2

5.3.1.2 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden adquirirse comercialmente listos para su uso o se pueden preparar en el laboratorio a partir de material deshidratado (el cual

contiene los componentes necesarios para elaborar cada uno de los tipos de medios existentes) tal y como aparece en la figura 9. Para su elaboración hay que seguir las instrucciones dadas por el fabricante, que se especifican en el prospecto del envase. Normalmente consiste en disolver el medio deshidratado en agua destilada, proceso que se conoce como reconstitución. La cantidad de agua será la que indica el fabricante.



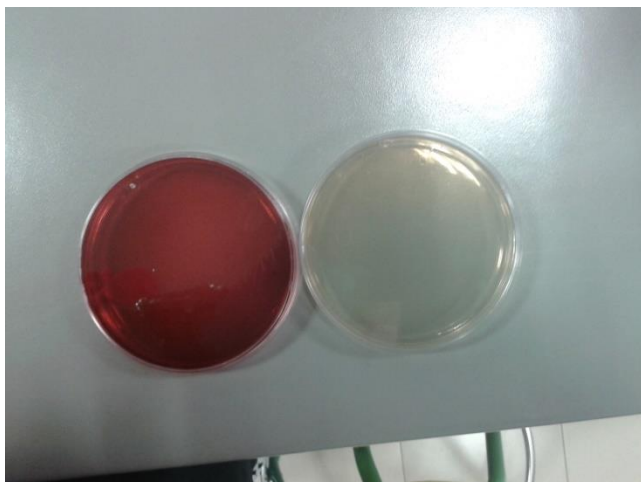
(Fig.9 Preparación de los medios de cultivo)

La preparación de cada uno de los medios se realiza pesando en la balanza analítica la cantidad adecuada de medio y diluyéndolas posteriormente en agua destilada. Las cantidades de medios y agua destilada fueron:

- MacConkey: 800 ml de agua + 28 g de MacConkey (Dilución original 35 g/l)
- Rothe: 800 ml de agua + 28,48 g de Rothe (Dilución original 35.6 g/l)
- EMB Agar: 800 ml de agua + 28,77 g de EMB (Dilución original 35.96 g/l)
- KAA Agar: 800 ml de agua + 38,4 g de KAA (Dilución original 48 g/l)

Una vez que los medios están diluidos en sus matraces, se procede a la esterilización por autoclavado. Después los medios sólidos (EMB y KAA) se atemperan a 50°C y se vierten en placas Petri, con la suficiente cantidad para cubrir el fondo. Estas placas se dejan enfriar y a continuación, con un rotulador indeleble, se escribe en la base de cada placa el tipo de medio que contiene.

Cada semana se repondrán los medios de cultivo en función del número de placas que hagan falta para la siguiente siembra.



(Fig.10 Placas de EMB y KAA preparadas)

En el caso de los medios líquidos (MacConkey y Rothe), después del autoclavado y dejar que se atemperen, se vierte usando una pipeta automática la cantidad correcta en cada tubo, asegurándose en el caso del medio MacConkey que los tubos tienen colocada una campana de Durham para recogida de gases.



(Fig.11 Tubo con Caldo MacConkey (izquierda) y tubo con Caldo Rothe (derecha) preparados)

5.3.2 Determinación de bacterias coliformes (colimetría)

Se trata de determinar el número de coliformes mediante siembra de distintos volúmenes del agua a analizar en series de tubos conteniendo medio de cultivo líquido lactosado y resiembra en medios de cultivo selectivos con incubación a

37°C durante un período determinado. El medio de cultivo líquido ha sido el caldo MacConkey, mientras que el medio sólido contenido en las placas de Petri es EMB.

El procedimiento comprende la prueba presuntiva y la de confirmación de coliformes totales.

Prueba presuntiva

Se parte de 100 ml de muestra de agua tomada de cada una de las 5 localizaciones. Se siembra una batería con tres series de tubos con el medio de cultivo adecuado. Para este proyecto he usado caldo MacConkey para la detección de coliformes.

Los tubos se preparan siguiendo el siguiente esquema:

- Tres tubos con 10 ml de medio a doble concentración: 10 ml de muestra
- Tres tubos con 10 ml de medio a concentración simple: 1 ml de muestra
- Tres tubos con 10 ml de medio a concentración simple: 0,1 ml de muestra



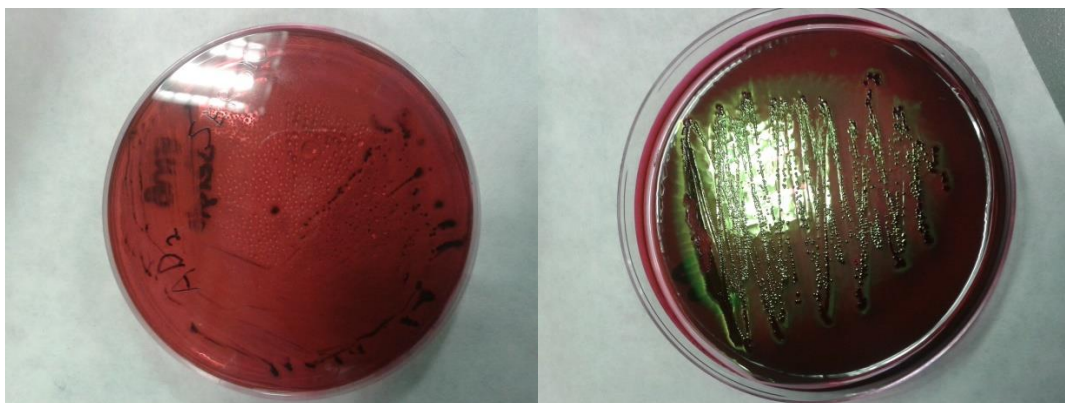
(Fig.12 Serie de 9 tubos de medio MacConkey)

Los tubos se incuban en la estufa de cultivo microbiológico a 37°C durante 48 h, después de ese período se comprueban los tubos que han dado positivo. Se consideran tubos positivos aquellos en los que se observa viraje del indicador,

debido a la acidificación del medio, y aparición de gas en la campana de fermentación.

Prueba de confirmación de coliformes totales

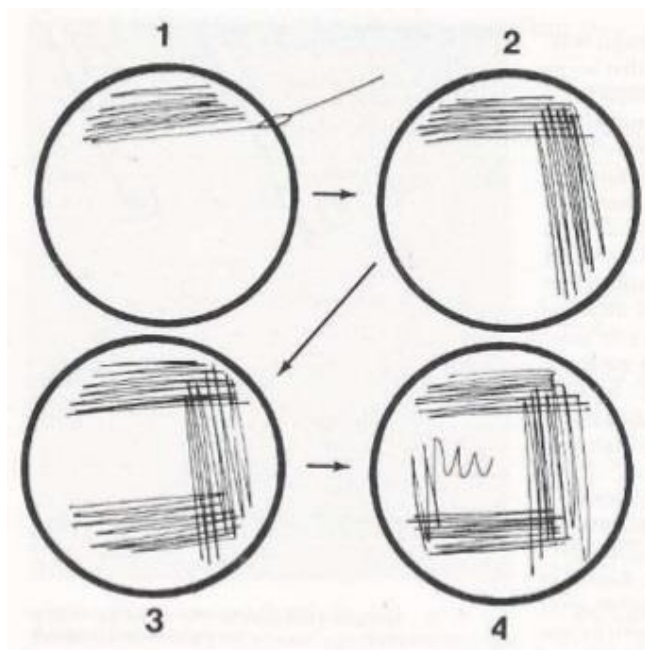
Sometemos a esta prueba todos los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva. A partir de éstos, y después de homogeneizar su contenido mediante el uso de un agitador-mezclador Vortex, se sembrará, mediante asa y por agotamiento, sobre la superficie de placas de Petri conteniendo medio de EMB. A continuación se incubará a 37°C durante 48 h.



(Fig.13 A la izquierda vemos una placa con colonias desarrolladas, a la derecha vemos una placa con colonias con resplandor metálico indicativo de *E.coli*)

Sobre el agar EMB las bacterias fermentadoras de la lactosa desarrollan colonias de un tono opaco, pigmentadas en rosa, azul violeta oscuro. Las muestras que presentan reflejo metálico indican la presencia de *E.coli* en la muestra analizada. Las colonias distintas de las descritas corresponden a bacterias no fermentadoras de la lactosa.

Sobre las placas de las bacterias fermentadoras de la lactosa presentan una coloración fucsia. De cada placa, se selecciona una colonia de cada uno de los diferentes aspectos descritos anteriormente y se resiembró en estrías siguiendo un esquema similar al que aparece en la figura 14.



(Fig.14 Esquema de realización de siembra en estría cruzada)

Posteriormente, mediante asa se resiembraba una colonia en un tubo de caldo MacConkey, con campana de Durham, incubándose de nuevo a 37°C durante 48 h. Tras este período vemos que tubos son positivos basándonos en el viraje de color y aparición de gas en la campana de Durham.



(Fig.15 Tubos con MacConkey positivos)

La lectura e interpretación de los resultados se realiza comparando el número de tubos positivos de cada serie con una tabla de probabilidades, y se estima el número más probable (NMP) de microorganismos por 100 ml de muestra.

5.3.3 Determinación de estreptococos fecales (estreptometría)

En este caso se trata de determinar el número de estreptococos fecales y al igual que en la determinación de bacterias coliformes, se realiza mediante siembra de distintos volúmenes del agua a analizar en series de tubos conteniendo medio de cultivo líquido Rothe y se resiembra en medios de cultivo selectivos con incubación a 37°C durante un período determinado. El medio sólido contenido en las placas de Petri en este caso es KAA.

El procedimiento comprende la prueba presuntiva y la de confirmación de enterococos fecales.

Prueba presuntiva

Se parte de 100 ml de muestra de agua tomada de cada una de las 5 localizaciones. Se siembra una batería con tres series de tubos con el medio de cultivo adecuado, para este caso he usado caldo Rothe para la detección de estreptococos.

Los tubos se preparan siguiendo el siguiente esquema:

- Tres tubos con 10 ml de medio a doble concentración: 10 ml de muestra
- Tres tubos con 10 ml de medio a concentración simple: 1 ml de muestra
- Tres tubos con 10 ml de medio a concentración simple: 0,1 ml de muestra



(Fig.16 Serie de 9 tubos de medio Rothe)

Los tubos se incuban en la estufa de cultivo microbiológico a 37°C durante 48 h. Después de ese período se comprueban los tubos que han dado positivo. Se consideran tubos positivos aquellos en los que se observa un enturbiamiento de color en el tubo y el sedimento coloreado característicos.

Prueba de confirmación de estreptococos fecales

Sometemos a esta prueba todos los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva. A partir de éstos, y después de homogeneizar su contenido mediante el uso de un agitador-mezclador Vortex, se sembrará, mediante asa y por agotamiento, sobre la superficie de placas de Petri conteniendo medio de EMB. A continuación se incubará a 37°C durante 48 h.



(Fig.17 Placa con colonias de estreptococos)

La prueba de la catalasa es otra de las pruebas confirmativas. La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Para esta prueba colocamos una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos de microscopio, después cogemos una colonia de bacterias mediante un asa y agitamos la colonia bacteriana en el peróxido de hidrógeno para que se formen burbujas. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es negativa e indicaría la presencia de *Staphylococcus*.

La lectura e interpretación de los resultados se realiza comparando el número de tubos positivos de cada serie con una tabla probabilidades, y se estima el número más probable (NMP) de microorganismos por 100 ml.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Pruebas presuntivas

A continuación se muestra las tablas que contienen el número de resultados positivos obtenidos en las pruebas presuntivas de colimetría y estreptometría realizados a las muestra de las 5 localizaciones durante los 3 muestreos.

		PRUEBA PRESUNTIVA 1					
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
MacConkey (Colimetría)	Concentración doble	2	3	1	3	3	
	Concentración 1ml	0	0	0	3	3	
	Concentración 0,1ml	0	0	0	3	1	TOTAL
	Total positivos MacConkey	2	3	1	9	7	22
Rothe (estreptometría)	Concentración doble	0	3	3	3	1	
	Concentración 1ml	0	0	1	3	0	
	Concentración 0,1ml	0	0	0	3	0	TOTAL
	Total positivos Rothe	0	3	4	9	1	17

(Tabla 1)

		PRUEBA PRESUNTIVA 2					
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
MacConkey (Colimetría)	Concentración doble	1	3	1	3	3	
	Concentración 1ml	0	2	0	3	3	
	Concentración 0,1ml	0	2	0	3	3	TOTAL
	Total positivos MacConkey	1	7	1	9	9	27
Rothe (estreptometría)	Concentración doble	3	3	3	3	3	
	Concentración 1ml	0	0	0	3	0	
	Concentración 0,1ml	1	0	0	3	0	TOTAL
	Total positivos Rothe	4	3	3	9	3	22

(Tabla 2)

		PRUEBA PRESUNTIVA 3					
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
MacConkey (Colimetría)	Concentración doble	3	3	3	3	3	
	Concentración 1ml	3	3	1	3	3	
	Concentración 0,1ml	3	3	0	3	3	TOTAL
	Total positivos MacConkey	9	9	4	9	9	40
Rothe (estreptometría)	Concentración doble	3	3	3	3	3	
	Concentración 1ml	3	2	2	0	3	
	Concentración 0,1ml	3	0	2	3	3	TOTAL
	Total positivos Rothe	9	5	7	6	9	36

(Tabla 3)

6.2 Prueba confirmativas

Las siguientes tablas muestran el número de resultados positivos obtenidos en las pruebas presuntivas de colimetría y estreptometría, incluyendo los resultados de la prueba de la catalasa y presencia de *E.coli* en las muestras de las 5 localizaciones durante los 3 muestreos.

		PRUEBA CONFIRMATIVA 1					
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
KAA (estreptometría)	Concentración doble	NA	1	0	3	0	
	Concentración 1ml	NA	0	0	3	0	
	Concentración 0,1ml	NA	0	0	3	0	TOTAL
	Total positivos KAA	NA	1	0	9	0	10
EMB (Colimetría)	Concentración doble	2	2	1	3	3	
	Concentración 1ml	NA	NA	NA	3	0	
	Concentración 0,1ml	NA	NA	NA	3	1	TOTAL
	Total positivos EMB	2	2	1	9	4	18
Catalasa (Staphylococcus en estreptometría)	Concentración doble	NA	0	0	2	NA	
	Concentración 1ml	NA	NA	0	1	NA	
	Concentración 0,1ml	NA	NA	NA	0	NA	TOTAL
	Total positivos catalasa	NA	0	0	3	NA	3
MacConkey (Resiembra)	Concentración doble	2	0	0	2	3	
	Concentración 1ml	NA	NA	NA	3	NA	
	Concentración 0,1ml	NA	NA	NA	3	0	TOTAL
	Total positivos MacConkey	2	0	0	8	3	13
E. Coli	Concentración doble	0	0	0	0	2	
	Concentración 1ml	0	0	0	1	0	
	Concentración 0,1ml	0	0	0	2	1	TOTAL
	Total positivos Lactosado	0	0	0	3	3	6

(Tabla 4)

		PRUEBA CONFIRMATIVA 2					
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
KAA (estreptometría)	Concentración doble	3	0	1	3	3	
	Concentración 1ml	NA	NA	NA	3	NA	
	Concentración 0,1ml	1	NA	NA	3	NA	TOTAL
	Total positivos KAA	4	0	1	9	3	17
EMB (Colimetría)	Concentración doble	1	3	0	3	3	
	Concentración 1ml	NA	0	NA	3	3	
	Concentración 0,1ml	NA	0	NA	3	3	TOTAL
	Total positivos EMB	1	3	0	9	9	22
Catalasa (Staphylococcus en estreptometría)	Concentración doble	0	NA	1	1	1	
	Concentración 1ml	NA	NA	NA	1	NA	
	Concentración 0,1ml	0	NA	NA	1	NA	TOTAL
	Total positivos catalasa	0	0	1	3	1	5
MacConkey (Resiembra)	Concentración doble	1	2	NA	2	3	
	Concentración 1ml	NA	NA	NA	1	2	
	Concentración 0,1ml	NA	NA	NA	2	3	TOTAL
	Total positivos MacConkey	1	2	0	5	8	16
E. Coli	Concentración doble	1	2	0	3	3	
	Concentración 1ml	0	0	0	0	2	
	Concentración 0,1ml	0	0	0	0	2	TOTAL
	Total positivos Lactosado	1	2	0	3	7	13

(Tabla 5)

		PRUEBA CONFIRMATIVA 3					
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
KAA (estreptometría)	Concentración doble	2	3	3	3	1	
	Concentración 1ml	3	3	2	NA	2	
	Concentración 0,1ml	3	NA	0	3	3	TOTAL
	Total positivos KAA	8	6	5	6	6	31
EMB (Colimetría)	Concentración doble	2	0	2	2	1	
	Concentración 1ml	3	1	1	3	3	
	Concentración 0,1ml	3	1	NA	3	3	TOTAL
	Total positivos EMB	8	2	3	8	7	28
Catalasa (Staphylococcus en estreptometría)	Concentración doble	0	0	1	0	0	
	Concentración 1ml	1	0	1	NA	0	
	Concentración 0,1ml	3	NA	0	0	2	TOTAL
	Total positivos catalasa	4	0	2	0	2	8
MacConkey (Resiembra)	Concentración doble	1	NA	2	2	1	
	Concentración 1ml	3	1	1	3	1	
	Concentración 0,1ml	2	1	NA	3	0	TOTAL
	Total positivos MacConkey	6	2	3	8	2	21
E. Coli	Concentración doble	2	1	2	2	0	
	Concentración 1ml	3	0	0	3	0	
	Concentración 0,1ml	3	0	0	2	0	TOTAL
	Total positivos Lactosado	8	1	2	7	0	18

(Tabla 6)

6.3 Interpretación de los datos obtenidos

Una vez obtenidos todos los resultados podemos comparar las distintas muestras de aguas y destacar varias observaciones basándonos en el lugar de muestra, la fecha de muestreo y el tipo de prueba realizada. Antes de realizar esas comparaciones necesitaremos una tabla de probabilidades para determinar el número más probable (NMP) basándonos en la cantidad de positivos en las pruebas de colimetría y esteptometría.

		COLIMETRÍA				
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir
Muestreo 1		2	0	0	8	3
Muestreo 2		1	2	0	5	8
Muestreo 3		6	2	3	8	2
Total		9	4	3	21	13

(Tabla 7)

		ESTEPTOMETRÍA				
		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir
Muestreo 1		0	1	0	9	0
Muestreo 2		4	0	1	9	3
Muestreo 3		8	6	5	6	6
Total		12	7	6	24	9

(Tabla 8)

Number of Positive Tubes in Dilutions				Number of Positive Tubes in Dilutions			
10 mL	1 mL	0.1 mL	MPN per 100 mL	10 mL	1 mL	0.1 mL	MPN per 100 mL
0	0	0	0	2	0	0	9.1
0	0	0	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	450
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	—	—	—	>100

Table 9-1 Most Probable Number (MPN) table used for evaluation of the data in this experiment, using three tubes in each dilution. The value printed white on black is referred to in the example in the Calculations section on.

(Fig.18 Tabla NMP)

Usando los valores de las tablas 7 y 8 sobre lo indicado en la tabla que aparece en la figura 18, obtenemos el número más probable de bacterias coliformes y estreptococos en cada una de las muestras analizadas. Los resultados podemos observarlos en la siguiente tabla.

		Almenara	Particiones	Salado	Guadalbullón	Guadalquivir	
M U E S T R E O 1	estreptometría	0	1	0	1	0	
		0	0	0	2	0	
		0	0	0	3	0	
		<3	3,6	<3	24	<3	NMP
	colimetría	2	0	0	2	3	
		0	0	0	3	0	
		0	0	0	3	0	
		9,1	<3	<3	53	23	NMP
M U E S T R E O 2	estreptometría	3	0	0	2	2	
		0	0	0	2	0	
		1	0	0	2	0	
		39	<3	<3	35	9,1	NMP
	colimetría	1	2	0	2	3	
		0	0	0	1	2	
		0	0	0	2	3	
		3,6	9,1	<3	27	290	NMP
M U E S T R E O 3	estreptometría	2	3	2	3	1	
		2	3	1	0	2	
		0	0	0	3	1	
		21	240	15	95	15	NMP
	colimetría	1	0	2	2	1	
		3	1	1	3	1	
		2	1	0	3	0	
		24	6,1	15	53	7,3	NMP

(Tabla 9)

6.4 Análisis estadístico basado en los resultados de NMP

Con los datos reflejados en la tabla 9 realizamos dos tipos de análisis haciendo uso de un software estadístico: ANOVA de un factor y la Prueba de Kruskal-Wallis.

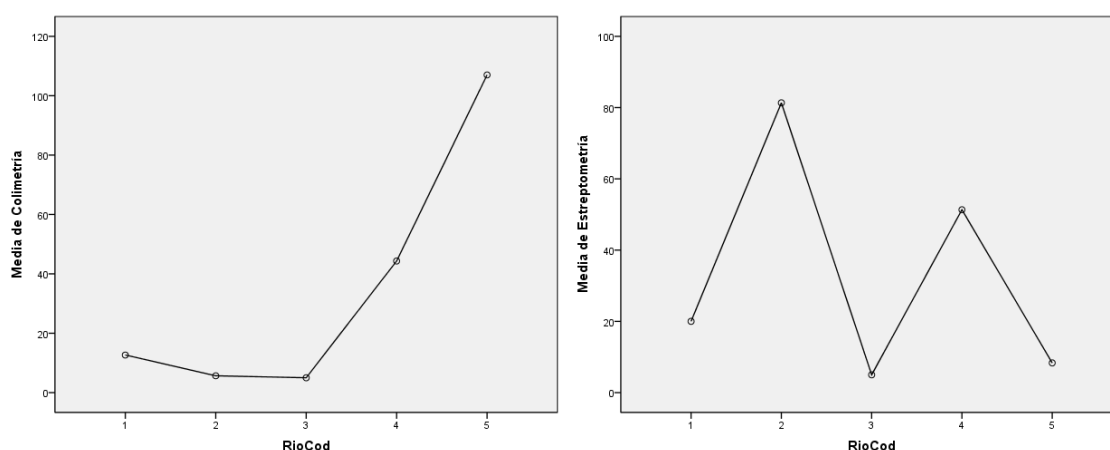
6.4.1 Análisis ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal (Sidney Siegel and N. John Castellan Jr, 1988)

El objetivo principal del ANOVA es contrastar si existen diferencias entre las diferentes medias de los niveles de las variables (factores). El ANOVA requiere el cumplimiento los siguientes supuestos:

- Las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales.
- Las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes.
- Las poblaciones tienen todas igual varianza (homoscedasticidad).

Después de introducir los datos de la tabla 9 en nuestro software obtenemos lo siguiente:



(Fig.19 Gráficas de los valores medios de la colimetría y la estreptometría)

		N	Media	Desviación típica	Error típico
Estreptometría	1	3	20,00	19,519	11,269
	2	3	81,33	137,424	79,342
	3	3	5,00	8,660	5,000
	4	3	51,33	38,214	22,063
	5	3	8,33	7,638	4,410
	Total	15	33,20	62,347	16,098
Colimetría	1	3	12,67	10,263	5,925
	2	3	5,67	5,132	2,963
	3	3	5,00	8,660	5,000
	4	3	44,33	15,011	8,667

5	3	107,00	158,660	91,602
Total	15	34,93	72,605	18,747

(Tabla 10)

		Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior		
Estreptometría	1	-28,49	68,49	0	39
	2	-260,05	422,71	0	240
	3	-16,51	26,51	0	15
	4	-43,60	146,26	24	95
	5	-10,64	27,31	0	15
	Total	-1,33	67,73	0	240
Colimetría	1	-12,83	38,16	4	24
	2	-7,08	18,41	0	10
	3	-16,51	26,51	0	15
	4	7,04	81,62	27	53
	5	-287,13	501,13	8	290
	Total	-5,27	75,14	0	290

(Tabla 11)

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Estreptometría	11,039	4	10	,001
Colimetría	13,605	4	10	,000

(Tabla 12)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Estreptometría	Inter-grupos	12700,400	4	3175,100	,761	,574
	Intra-grupos	41720,000	10	4172,000		
	Total	54420,400	14			
Colimetría	Inter-grupos	22590,933	4	5647,733	1,103	,407
	Intra-grupos	51210,000	10	5121,000		
	Total	73800,933	14			

(Tabla 13)

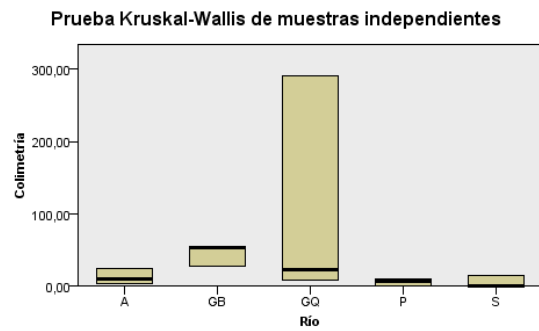
Pruebas robustas de igualdad de las medias

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Estreptometría	Welch	1,073	4	4,681	,462
	Brown-Forsythe	,761	4	2,425	,625
Colimetría	Welch	3,515	4	4,698	,107
	Brown-Forsythe	1,103	4	2,069	,523

(Tabla 14)

6.4.2 Prueba de Kruskal-Wallis

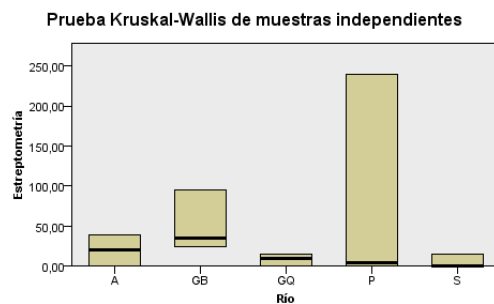
El uso de la prueba de Kruskal-Wallis constituye una alternativa no paramétrica al uso del ANOVA de un factor, es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA pero con los datos reemplazados por categorías. (Sidney Siegel and N. John Castellan Jr, 1988)



N total	15
Probar estadística	8.213
Grados de libertad	4
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	.084

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

(Fig.20 Prueba de muestras independientes de la colimetría)



N total	15
Probar estadística	5.082
Grados de libertad	4
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	.279

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

(Fig.21 Prueba de muestras independientes de la estreptometría)

6.5 Discusión de los resultados

Tras ver los datos de las pruebas confirmativas, podemos observar que en la prueba de colimetría los mayores valores se dan en los ríos Guadalbullón y Guadalquivir respectivamente y esto es debido a que de las 5 zonas de muestreo elegidas, estas dos últimas están rodeadas de núcleos de población más importantes y por tanto son más susceptibles a la contaminación procedente de las actividades ganaderas/agrícolas y de las aguas residuales urbanas. Aunque tanto Guadalbullón como Guadalquivir son las dos zonas con valores más altos, el Guadalbullón es con diferencia donde más se destaca la presencia de bacterias coliformes a pesar de ser un río con menos poblaciones circundantes que el Guadalquivir y esto se puede atribuir a los vertidos de aguas residuales de pequeños núcleos de población cuyos ayuntamientos no poseen sistemas de depuración de aguas residuales adecuados.

Siguiendo el análisis de los resultados de todas las pruebas realizadas observamos que en la laguna de Almenara se produce un aumento en los valores de colimetría, estreptometría y número de resultados positivos de *Staphylococcus* y *E.coli* en el tercer muestreo. Esto probablemente es debido a la presencia de precipitaciones en ese día de muestreo que produjo que restos biológicos de animales (cadáveres y heces) convergieran por escorrentía superficial hacia la laguna aumentando la presencia de microorganismos, esto sumado a que la masa de agua de la laguna es menor a la de los otros lugares de muestreo hace que se amplifique los niveles de microorganismos detectados.

Para sacar conclusiones de los hechos mencionados en los dos párrafos anteriores se procedió en primer lugar a la realización de un análisis ANOVA de los datos de las pruebas confirmativas de estreptometría y colimetría. Tras realizar este análisis mediante el software SPSS, observamos en las tablas 12, 13 y 14 que no se cumplen los requisitos de normalidad, ni de homocedasticidad, y, en cualquier caso, los valores de significación son superiores a 0.05 por lo que no existen diferencias significativas entre los grupos de muestras analizadas.

Tras los resultados obtenidos en el ANOVA se realizó el test de Kruskal-Wallis como una alternativa no paramétrica al ANOVA ya que no tenemos los requerimientos de normalidad y homocedasticidad necesarios. Tras realizar este tipo de análisis con el mismo software vemos que los datos obtenidos en la estreptometría (figura 21) no son significativos, pero los datos obtenidos en la colimetría (figura 20) dan un nivel de significación de 0.084 que aunque está por encima del 0.05 requerido para rechazar la hipótesis nula, está por debajo de 0.1 que es otro de los niveles de significación usados como referencia por lo que podríamos deducir que en la prueba de colimetría se observa una buena tendencia hacia una diferencia significativa entre las distintas muestras.

7 CONCLUSIONES

El análisis microbiológico es una forma útil para detectar contaminaciones fecales del agua y determinar la calidad de las aguas de las distintas zonas de agua dulce de la provincia.

A partir de los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado la presencia de distintos grupos bacterianos en todas las muestras de aguas.
- En base al análisis ANOVA y a la prueba de Kruskal-Wallis, no se encuentran diferencias significativas en cuanto a la presencia de microorganismos aislados en las 5 localizaciones escogidas.
- Las aguas de algunos ríos de la provincia como el Guadalbullón necesitan un mayor control de las autoridades competentes para reducir la contaminación en estos.

8 BILIOGRAFÍA

- Britton, L.J., Greeson, P.E. (1989). Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples.

- Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev Cubana Hig Epidemiol*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Guías para la calidad del agua potable, PRIMER APÉNDICE A LA TERCERA EDICIÓN Volumen 1, Recomendaciones.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx*.
- Panreac Química S.A. (2013). Manual Básico de Microbiología CULTIMED.
- Pascual Anderson, R., Calderón, V., Pascual. (1992). Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas.
- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
- Siegel, S., Castellan, Jr. (1988). Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences (second edition) McGraw-Hill.

9 LINKS DE PÁGINAS WEB UTILIZADAS:

- <http://www.ugr.es/~cjl/colimetria.pdf>
- <http://www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf>
- <http://www.redjaen.es/francis/?m=c&o=97002>
- <http://paisajeyterritorio.es/assets/guadalbullon.pdf>