



CONAMA10
CONGRESO NACIONAL
DEL MEDIO AMBIENTE

COMUNICACIÓN TÉCNICA

Calidad Microbiológica del río Henares

Autor: Alba López García

Institución: Universidad de Alcalá

e-mail: albita_lg@hotmail.com

Otros Autores: Inmaculada Fernández (Dpto. de Microbiología y Parasitología de la universidad de Alcalá)

RESUMEN

El agua es un recurso limitado e indispensable tanto para la supervivencia de la vida como para la su evolución. En los últimos años los distintos avances tecnológicos y sociales han provocado una serie de cambios en su composición, llegando incluso a provocar una contaminación hídrica. Por ello es imprescindible la conservación de su calidad. Este estudio de investigación se ha realizado con el fin de valorar el estado de unos de los afluentes más significativos de río Jarama, el río Henares. El río Henares presenta un carácter periurbano destacado ya que discurre aledaño a diferentes núcleos urbanos. Es un ejemplo claro para valorar la influencia del hombre en una de nuestras fuentes naturales. Se ha analizado tanto su calidad sanitaria como la flora autóctona del mismo. El proyecto se ha llevado cabo en dos puntos de localización diferentes, el primero a lo largo del río, desde un punto cercano a su nacimiento hasta un punto cercano a su desembocadura y el segundo punto se ha realizado más concretamente en el municipio de Alcalá. En dicho análisis microbiológico se ha detectado la presencia por excelencia del microorganismo coliforme fecal *Eschericia Coli* en todos los tramos analizados, así como microorganismos propios del río y biodegradadores que participan en la autodepuración. No obstante, la densidad de los núcleos urbanos limítrofes provoca que sea necesario tomar medidas de saneamiento de los vertidos antes de que este sea arrojado al mismo, para así evitar procesos como la eutrofización.

Palabras Clave: Río Henares, autodepuración, contaminación, microorganismos, E Coli

1. INTRODUCCIÓN

1. El agua

1.1.1 La importancia del agua y sus usos

El agua constituye el líquido más abundante en la Tierra y representa el recurso natural más importante, al mismo tiempo que es la base de toda forma de vida (Marcano, 2004).

El agua compone más del 80% del cuerpo de la mayoría de los organismos, e interviene en la mayor parte de los procesos metabólicos que se realizan en los seres vivos. Desempeña de forma especial un importante papel en la fotosíntesis de las plantas, sirve de hábitat a una gran parte de los organismos, es el medio para la realización de procesos geoquímicos y además regula la temperatura del planeta.

El agua es, como ya sabemos, una sustancia imprescindible para la vida por sus múltiples propiedades y se puede afirmar que es el eje de los procesos ecológicos donde se sustenta la biodiversidad. Pero hay que tener en cuenta que el agua es un recurso limitado puesto que la cantidad disponible está condicionada por su desigual distribución en el espacio y en el tiempo (Calvo. D y col, 2001)

En la última época se ha producido un aumento de la necesidad de agua debido al continuo desarrollo tecnológico y humano. Sin embargo, el aumento en el consumo del agua y la escasez de la misma suponen un grave problema en relación a este recurso tan necesario (Gray, 2004).

Este elemento es ampliamente utilizado en actividades diarias, tales como la agricultura, la industria o el uso doméstico. Los usos que se otorgan al agua van desde el consumo humano; el consumo público; el riego en la agricultura y la alimentación del ganado; etapas de producción y de lavado en diferentes procesos industriales; usos energéticos; al ocio y la navegación. (Calvo. D y col, 2001)

Este amplio rango de utilidades convierten el agua en uno de los recursos más apreciados. De ahí la importancia de conservar y mantener la calidad de las fuentes naturales de agua, de manera que se garantice su sostenibilidad y aprovechamiento para las futuras generaciones.

La calidad de cualquier masa de agua, superficial o subterránea, depende tanto de factores naturales como de la acción humana. Sin esta última, la calidad del agua vendría determinada por la erosión del substrato mineral, la lixiviación natural de la materia orgánica, la lixiviación de los nutrientes del suelo por los factores hidrológicos y los procesos biológicos en el medio acuático (Aguado, 2009). Pero con la acción humana la situación es muy distinta, ya que la contaminación proviene de fuentes antropogénicas

muy variables, con productos de distintas naturaleza, los cuales afectan de manera diferente a la composición del agua.

No existen acuerdos ambientales vinculantes de carácter mundial que obliguen a los Estados a proteger los recursos hídricos de la contaminación, ya que se trata de una responsabilidad nacional de los gobiernos (Agudo, 2009). Los criterios para la determinación de lo que constituye el “buen estado” de las aguas se determinan sobre la base de unos factores cualitativos y cuantitativos exhaustivos, como la abundancia de flora y fauna acuáticas, el grado de salinidad, la cantidad y la dinámica de la corriente de agua, las concentraciones de nutrientes y microorganismos y otros criterios (Unwater, 2010).

La calidad del agua necesaria para cada uso humano varía al igual que los criterios utilizados para evaluarla. Desde el punto de vista administrativo, la calidad del agua se define por su uso final deseado. Por esta razón, la definición que se puede dar de calidad llega a ser amplia (CEPE, 1995). En consecuencia, para el uso recreativo, así como para la pesca, para el consumo humano y para el hábitat de organismos acuáticos se requieren altos niveles de pureza, mientras que para la producción de energía hidroeléctrica las normas de calidad son mucho menos exigentes.

Es importante señalar que el agua, después de ser utilizada, suele regresar al sistema hidrológico y, si no es tratada, puede afectar gravemente al medio (Agudo, 2009). Por lo que se puede considerar que la fuente más importante de la contaminación es la falta de gestión y tratamiento adecuados de los residuos humanos, industriales y agrícolas.

1.1.2. Justificación de la zona de estudio

Las vegas regadas por el río Henares se encuentran entre las más fértiles y ricas del centro peninsular, de ahí que hayan servido de lugar de desarrollo de numerosas civilizaciones (Informe sobre el estado de conservación del río Henares, 2009). El conjunto formado por el propio río, sus riberas y los cultivos tradicionales de sus vegas ha constituido, y hoy sigue constituyendo en muchos casos, un ecosistema de gran biodiversidad que sirve de hábitat para numerosas especies de flora y fauna. Además, el río Henares tiene la función básica de corredor biológico y de conexión entre espacios naturales. Todos estos valores son reconocidos por varias figuras de protección, destacando su pertenencia a la Red Natura 2000 y al Parque Regional del Sureste en su tramo final.

Debido al rápido crecimiento de la población y al desarrollo industrial del corredor del Henares, en los últimos tiempos se ha producido un grave deterioro de las aguas del río que ha llevado a la desaparición de gran parte de sus bosques de ribera y la ocupación desordenada e irracional de su vega (Informe sobre el estado de conservación del río Henares, 2009). A lo largo de su recorrido, el Henares soporta impactos de diversa índole, como son vertidos, escombros, infraestructuras, ocupaciones ilegales, deforestaciones y regulación de sus caudales, entre otros.

La importancia del río Henares tanto a nivel fluvial como de ecosistema, junto con su proximidad al campus externo de la Universidad de Alcalá, han sido los factores determinantes en su elección para llevar a cabo el estudio de la calidad microbiológica de sus aguas, realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de dicha universidad.

1.2. El río Henares

1.2.1. Características de la zona de estudio

El Henares nace a unos 1.100 metros de altitud en la sierra Ministra, cerca de la localidad de Horna (Guadalajara), y tras recorrer unos 170 Km desemboca en el Jarama dentro del término municipal de Mejorada del Campo (Madrid). Sus afluentes más importantes por la margen derecha son los ríos Salado, Cañamares, Bornova y Sorbe, mientras que por la izquierda recibe a los ríos Dulce y Badiel.

La cuenca del Henares, con una extensión aproximada de 4.140 Km², es una de las más fértiles y de mayor valor ecológico de la cuenca del Tajo, a pesar de los múltiples impactos ambientales que soporta. Por esta riqueza ha sido nombrada LIC (Lugar de Importancia Comunitaria) por la Comisión Europea en el listado de la región biogeográfica mediterránea (Proyecto del Henares, 2009). De este modo se reconoce la función básica del río como corredor biológico que permite la conexión entre los diferentes espacios naturales y las especies que los habitan.

A la hora de hablar de este río hay que destacar el carácter periurbano debido a que discurre por núcleos urbanos importantes que, ordenados geográficamente, son: Sigüenza; Jadraque; Humanes; Guadalajara y Azuqueca de Henares en la provincia de Guadalajara y Alcalá de Henares; Torrejón de Ardoz; Mejorada del Campo y San Fernando de Henares en la Comunidad de Madrid (Figura 1.1). Este carácter urbano explica los múltiples impactos ambientales mencionados anteriormente y consecuentemente, su continua degradación.

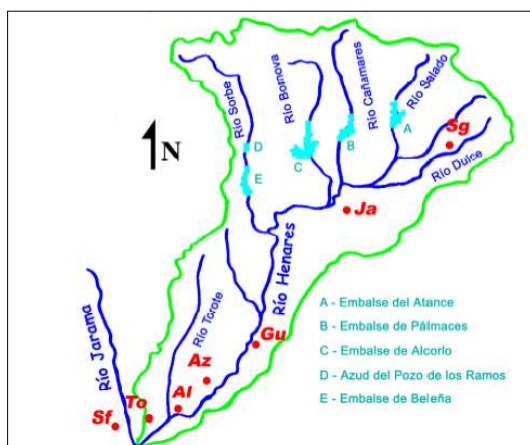


Fig.1.1 Cauces y Embalses de la Demarcación Hidrográfica del Tajo (Informe sobre el Estado de conservación del río Henares, 2009). Localización de Municipios: Sg (Sigüenza), Ja (Jadraque), Gu (Guadalajara), Az (Azuqueca de Henares), Al (Alcalá de Henares), To (Torrejón de Ardoz) y Sf (San Fernando de Henares).

1.3. El agua y los microorganismos

1.3.1. Enfermedades infecciosas transmitidas por el agua

El agua hace posible un medio ambiente saludable pero, paradójicamente, también puede ser el principal vehículo de transmisión de enfermedades. Las afecciones que se propagan por el agua se conocen como "enfermedades transmitidas por el agua". Los principales agentes causantes de estas enfermedades son microorganismos patógenos (CYTDE, 2001).

Estos microorganismos, procedentes de individuos enfermos, llegan a los cursos de agua a través de las descargas de aguas residuales sin tratar o con tratamiento deficiente, del drenaje de lluvias y de descargas generadas en la producción de alimentos, propagándose en el agua con gran rapidez. La transmisión sucede en el momento que los excrementos portadores de organismos infecciosos son arrastrados por el agua o se lixivian hasta los manantiales de agua dulce, contaminando el agua potable y los alimentos.

La ruta primaria de infección es la ingestión de agua contaminada con microorganismos patógenos, pero los alimentos y utensilios de mesa lavados con agua contaminada pueden ser también vías de transmisión. Otras vías de contagio son la inhalación de aerosoles contaminados con microorganismos o el contacto con aguas de baño contaminadas (Atlas y Bartha, 2001).

Los patógenos de humanos que son transmitidos por el agua incluyen muchos tipos de microorganismos tales como: bacterias, virus, protozoos y, en ocasiones, helmintos (lombrices), todos ellos muy diferentes en tamaño, estructura y composición. Las enfermedades clásicas transmitidas por el agua son el cólera y las fiebres tifoideas, que frecuentemente han hecho estragos en áreas densamente pobladas a lo largo de la historia del hombre. Estas enfermedades han sido controladas de forma eficaz en países desarrollados mediante la protección de las fuentes de agua y el tratamiento de los aportes de agua contaminados (Maier et al., 2000). En la tabla 1.1 se detallan las rutas de transmisión de patógenos a través del agua y algunos ejemplos de los microorganismos implicados.

Contaminación por:	Ingestión (bebida)	Inhalación y aspiración (aerosoles)	Contacto (baño)
<i>Ruta de Infección</i>	<i>Gastrointestinal</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Piel</i>
Patógenos	<i>Campilobacter spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Shigella spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia spp.</i> <i>Adenovirus</i> <i>Astrovirus</i> <i>Enterovirus</i> <i>Virus de la hepatitis A</i> <i>Virus de la hepatitis E</i> <i>Norovirus</i> <i>Rotavirus</i> <i>Sapovirus</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia intestinalis</i> <i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Micobacterias no tuberculosas</i> <i>Diversas infecciones virales</i>	<i>Acanthamoeba spp.</i> <i>Aeromonas spp.</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Micobacterias no tuberculosas</i> <i>Leptospira spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla 1.1. Rutas de transmisión de patógenos relacionados con el agua

1.3.2. Las aguas lólicas como ambiente microbiano

Los ríos son considerados ambientes de aguas dulces en movimiento, es decir, de aguas lólicas. Los ríos se caracterizan por ser sistemas dinámicos con zonas de movimiento rápido de agua y remansos con una corriente reducida. La velocidad del agua influye en la cantidad de oxígeno y de otros materiales que entran en ella. Los ríos tienen una gran interfase con la litosfera a lo largo de las orillas. Debido a esto, reciben gran cantidad de compuestos químicos a través de las corrientes del agua de lluvia y la erosión de las orillas (Atlas y Bartha, 2001). Gran parte de los nutrientes utilizados por los microorganismos de un río proceden del sistema terrestre que lo rodea. Por eso, las poblaciones microbianas que habitan en las aguas lólicas reflejan las condiciones terrestres, incluyendo los efectos de las prácticas domésticas, agrícolas o industriales.

Los microorganismos de los ríos viven principalmente adheridos a superficies tales como rocas sumergidas formando biopelículas. Los nutrientes disueltos son rápidamente absorbidos por estos microorganismos unidos a rocas y son liberados cuando los microorganismos mueren y se degradan para ser absorbidos de nuevo. Por eso, el reciclado de los nutrientes en un río no ocurre en un lugar, sino que hay un cierto grado de transporte río abajo antes de que el ciclo se complete. Este fenómeno es conocido como espiral de nutrientes.

1.3.3. La importancia de los microorganismos en la limpieza de las aguas contaminadas

Autodepuración de un río y depuración de aguas residuales

La calidad del agua de los ríos estará muy influenciado por el uso al que se someta, de tal modo que este uso puede ir degradándola. Los índices de calidad del agua de los ríos disminuyen con la proximidad a los núcleos de población, donde se reduce su caudal y aumentan los vertidos. El mayor foco de degradación de la calidad del agua es el vertido de aguas residuales domésticas sin depurar así como vertidos industriales y lixiviados de granjas. Los efluentes de los municipios introducen en el agua de los ríos compuestos orgánicos en concentraciones muy elevadas. Sin embargo, los ríos son ecosistemas dinámicos que gracias a su flora autóctona están dotados de la capacidad de eliminar por sí mismos parte de la fracción contaminante, sobre todo si se trata de materia orgánica (Gray, 2004).

Normalmente, el agua de los tramos altos de los ríos es de buena calidad, apenas existen vertidos y su capacidad de autodepuración es alta debido a que sus aguas discurren de forma rápida y están oxigenadas. Por el contrario, la calidad del agua en los tramos bajos es mucho menor ya que reciben mayor cantidad de vertidos, y la capacidad de autodepuración es menor debido a la lentitud y poca oxigenación de las aguas (Ambientum, 2002)

La autodepuración de las aguas es un conjunto de fenómenos físicos, químicos y biológicos, que tienen lugar en el curso del agua de modo natural y que provocan la destrucción de materias extrañas incorporadas

La capacidad de autoregeneración de un río depende de los siguientes aspectos: el caudal, que permitirá diluir el vertido y facilitar su posterior degradación; la turbulencia del agua, que aportará oxígeno diluido al medio, favoreciendo la actividad microbiana y la naturaleza y tamaño del vertido.

La autoregeneración total dependerá de la cantidad de contaminantes, la naturaleza de los contaminantes, el vertido esporádico o permanente de efluentes, la temperatura, la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, y la capacidad de diluir los distintos materiales que afectan el ambiente acuático. En este sentido, la llegada de altas concentraciones de contaminantes puede anular el proceso de autodepuración, creando una zona contaminada que resultará difícil recuperar si no es de forma lenta y/o artificial. Si el vertido es excesivo, el oxígeno disuelto puede eliminarse por completo y el vertido puede llegar aguas abajo sin poderse degradar. Las aguas se vuelven permanentemente anóxicas y se favorecen los procesos metabólicos anaerobios que generan ácidos orgánicos, sulfuros, metano y otras sustancias tóxicas para la vida acuática.

Para evitar estas consecuencias, las aguas residuales generadas en los municipios han de ser tratadas antes de ser vertidas a un recurso natural de agua. Esto se consigue mediante distintos tratamientos de depuración en plantas depuradoras de aguas residuales (EDAR).

1.4. Objetivos

En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudio de la calidad sanitaria de las aguas del río Henares a través de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

Para el control de calidad microbiológica del río se requiere una serie de análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos. Para ello se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que puedan identificar mediante métodos sencillos y rápidos. El grupo más utilizado es el de bacterias coliformes, ya que es el más adecuado como indicador de contaminación bacteriana debido a que están en grandes cantidades, están presentes en el tracto intestinal y se comportan de igual manera que los patógenos.

2. Estudio de la flora microbiana del río Henares, que nos indicará por un lado, el grado de limpieza de las aguas, puesto que suele ser proporcional a la cantidad de materia orgánica biodegradable presente en el agua. Por otro lado, esta comunidad microbiana

participa activamente en el proceso de biodegradación de contaminantes orgánicos y por tanto en el proceso de autodepuración de los ríos.

Para la consecución de ambos objetivos se obtuvieron muestras en dos grupos de localización y dos épocas:

A su paso por los municipios de Sigüenza, Guadalajara, Jadraque, Azuqueca de Henares, Alcalá de Henares y Torrejón de Ardoz.

Y de una forma más precisa en el municipio de Alcalá de Henares. Se muestrearon diversos puntos con el fin de representar la calidad del agua antes de llegar al centro de la ciudad, en el momento que pasa por la ciudad y en el momento que el agua es vertida al río una vez tratada.

La toma de muestras se realizó en dos estaciones, invierno y primavera del 2010. Para poder realizar posteriormente una comparación, ya que estas dos épocas del año están diferenciadas por condiciones bastante heterogéneas que pueden afectar al crecimiento de los microorganismos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización de las muestras

Las muestras de agua del río Henares se recogieron en dos épocas y grupos de localización. Durante los meses de otoño del año 2009, se tomaron muestras en seis importantes municipios por los que discurre el río Henares: Sigüenza; Jadraque; Guadalajara; Azuqueca; Alcalá de Henares y Torrejón de Ardoz (Figura 2.1). Durante los meses de invierno y primavera del 2010, se tomaron muestras a cuatro niveles del río a su paso por la ciudad de Alcalá de Henares: Fuente de Luis Mariano; Isla de los colegios; Puente Zulema y Después de la depuradora (Figura 2.2).

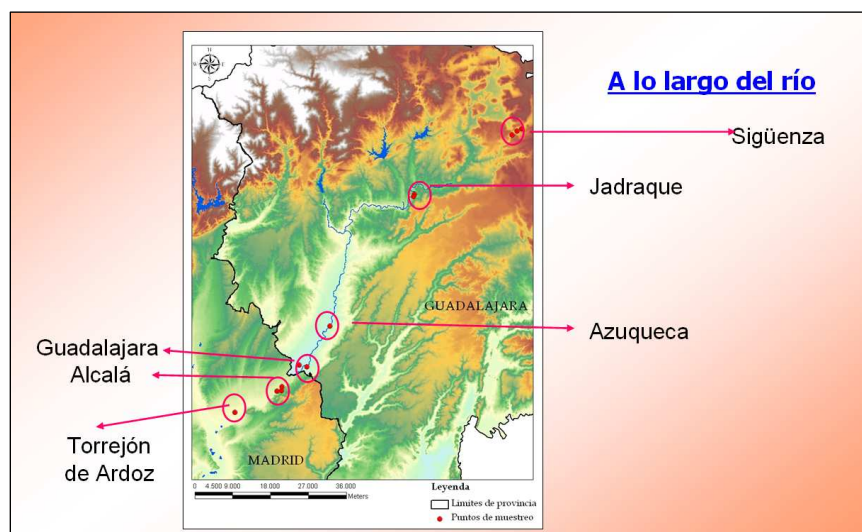


Fig.2.1. Localización de puntos de muestreo a lo largo del río Henares.



Fig.2.2. Localización de puntos de muestreo en el municipio de Alcalá (Google Earth)

Las muestras de agua de los municipios de Sigüenza, Jadraque, Guadalajara y Azuqueca de Henares, en la provincia de Guadalajara, y de Alcalá de Henares y Torrejón de Ardoz, en la provincia de Madrid, fueron recogidas por alumnos de Ciencias Ambientales de la UAH integrantes del “Proyecto de voluntariado del río Henares 2009-2010”. En el momento de la recogida de estas muestras se analizaron parámetros físico-químicos como el pH, nitratos, conductividad, turbidez, temperatura y oxígeno disuelto mediante el Kit de muestreo de Word Water Monitoring Day (DMCCA), proporcionado por el ministerio de medio ambiente rural y marino.

2.2. Análisis microbiológico

2.2.1. Indicadores de contaminación fecal

En el Real Decreto 140/2003, del 7 de febrero, se establecen los criterios sanitarios para la calidad del agua de consumo humano. Los métodos de ensayo utilizados por los laboratorios se han de ajustar a lo especificado en el anexo IV de este Real Decreto. Los resultados obtenidos en este análisis se compararán posteriormente con los valores que regula la legislación fijados en el anexo I del Real Decreto.

2.2.1.1. Coliformes

Las bacterias coliformes son un grupo de enterobacterias que se definen como bacilos Gram negativos que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 37°C.

○ **Colimetría presuntiva y recuento de coliformes**

El recuento de bacterias coliformes se llevó a cabo en medio líquido, Caldo Lactosado (CL), con adición de campanas Durham. El objetivo es obtener datos cuantitativos sobre la presencia de presuntas bacterias coliformes a través de la técnica del N.M.P (Número Más Probable).

El resultado final se obtuvo empleando una tabla de probabilidades llamada el Número Más Probable o NMP (Almenar, 1997). El número de tubos positivos (turbios y con al menos 10% de producción de gas) y negativos (transparentes y sin producción de gas o menos del 10%) de las tres series indican el número más probable de coliformes en 100 ml de agua.

○ **Colimetría confirmativa y coliformes fecales**

Los coliformes fecales, y en particular *E. coli*, son un subgrupo de los coliformes totales capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 44.5 °C en 24 horas.

Para detectar coliformes fecales se tomó una alícuota de un tubo positivo de CL obtenido en el ensayo anterior, se inoculó en un tubo de CL estéril y se incubó a 44 °C durante 24 horas. Además, otra alícuota del mismo tubo positivo se sembró en una placa con medio Levine y se incubó a 44 °C durante 24 horas.

La presencia de coliformes fecales en Levine, especialmente *E. coli*, se detectó por la aparición de colonias que presentaban un centro azul-negro con un brillo metálico al ser observadas con la luz reflejada. A veces el brillo no se manifestaba.

○ **Identificación: Pruebas IMVIC**

Las bacterias coliformes aisladas en medio Levine se identificaron mediante pruebas de confirmación complementarias (I.M.Vi.C.).

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes, su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria, al crecer, incorpora o no (Brock, 1993).

2.2.1.2. Enterococos fecales

Los enterococos fecales son cocos Gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos y catalasa negativos que fermentan la glucosa con producción de ácido. En este grupo se encuentra *Enterococcus faecalis* y su presencia se relaciona con la presencia de heces.

Un tubo con 9 ml de medio líquido KAA (Canamicina-Esculina-Azida) se inoculó con 1 ml de agua problema. A continuación se incubó a 37 °C durante 24 horas. Cuando los enterococos hidrolizan esculina se produce glucosa y esculina, esta última reacciona con el NH_4^+ y el Fe^{+3} que lleva el medio para dar un complejo negrozco. La aparición de color negro indica que la prueba es positiva.

Este análisis se complementó con la siembra en estría por agotamiento en placas de medio sólido KF que se incubaron a 37°C durante 48h. Posteriormente, se procedía al recuento de las colonias que presentaban una coloración granate, indicativo de la presencia de enterococos.

2.2.1.3. Clostridios sulfito reductores

Los clostridios son bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos, formadores de esporas. Reducen el sulfito a sulfuro, el cual reacciona con la sal de hierro, dando un precipitado de color negro.

Este análisis se llevó a cabo en el medio de cultivo Agar SPS((agar sulfito sódico). Se tomó 1 ml de la muestra problema y se vertió en una placa Petri. Posteriormente se mezcló con el medio SPS fundido y se incubó a 44°C durante 48 h. Los medios inoculados se introdujeron en una jarra de anaerobiosis junto con un sobre de Anaerogen para así crear una atmosfera anaerobia.

2.2.2. Recuento de mesófilos aerobios

Para este tipo de recuentos, alícuotas de 100 µl del agua problema se inocularon en medio sólido PCA y se incubaron durante 48 horas a dos temperaturas distintas, 37 °C y 22 °C.

Tras la incubación, se contó el número de colonias aisladas en la placa. Dicho número se transformó en el Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml de agua problema.

2.2.3. Recuento de pseudomonas

Para el recuento de pseudomonas, se inocularon 200 µl del agua problema en placas con medio sólido de agar Cetrimida y se incubaron durante 48 horas a dos temperaturas distintas, 37 °C y 22 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se contó en número de colonias para después obtener las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

2.2.4. Recuento de hongos y levaduras

La legislación española recomienda para este recuento el medio Sabouraud-glucosa. Se inocularon 200 µl de agua problema y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Una vez transcurrido el tiempo se contó el número de colonias para después obtener las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

2.3. Identificación de microorganismos

2.3.1. Bacterias

Como ensayo preliminar para conocer la flora bacteriana autóctona del río Henares se procedió a la identificación de algunas de las bacterias aisladas del agua. Para el aislamiento, se eligieron principalmente colonias bacterianas que habían crecido de forma peculiar en PCA o en agar Cetrimida, por su forma o su pigmentación.

El procedimiento que se llevó a cabo fue, en primer lugar, el aislamiento de colonias mediante la técnica de estrías por agotamiento utilizando el mismo medio de cultivo que la placa de partida. Los cultivos puros de bacterias así obtenidos fueron, en segundo lugar, resembrados en placas con medio PCA para su conservación.

En una primera etapa de identificación se analizaron aspectos del fenotipo bacteriano como la movilidad, morfología, tinción de Gram, oxidación/fermentación, actividad catalasa y actividad oxidasa. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas de identificación mediante Sistemas Api (Biomerieux).

2.3.2. Hongos

Con el fin de identificar los hongos presentes en las distintas zonas del río, se realizó, antes de todo, un aislamiento de las placas de SC donde había crecido inicialmente de forma conjunta, intentando separarlos por su distinta morfología y tonalidad. Una vez que ya se tenía la certeza que estaban totalmente aislados se utilizó la técnica de

cubeobjetos inclinados, con la finalidad de observar su morfología, la presencia de hifas o no y otros aspectos que permitiesen su identificación al microscopio.

3. RESULTADOS

3.1. Datos Físico químicos del río Henares

La toma de los datos físico químicos del río Henares se realizó durante los meses de otoño del año 2009.

Los datos físico químicos del río Henares representan una forma sencilla de identificar las variaciones composicionales, tanto espaciales como temporales, resultantes de cambios en factores naturales como la litología, relieve y vegetación entre otros. Además, son útiles para determinar el grado de contaminación tanto orgánica como inorgánica.

Mediante mediciones realizadas in situ se determinaron los valores de los parámetros del agua: turbidez, T^a del agua, oxígeno disuelto (OD), % saturación de O₂, concentración de nitratos (ppm), pH y dureza del agua. En las tablas 3.1 y 3.2 figuran los datos obtenidos.

Tabla 3.1. Datos físico químicos del agua del río Henares a nivel de Sigüenza, Jadraque y Guadalajara. (1, 2, 3) Diferentes puntos de muestreo.

<i>Parámetros/Puntos</i>	Sigüenza			Jadraque		Guadalajara		
	S1	S2	S3	J1	J2	G1	G2	G3
<i>Turbidez (JTU)</i>	40,00	40,00	40,00	40,00	20,00	0,00	0,00	0,00
<i>T^a agua (°C)</i>	10,00	9,00	10,00	15,80	16,00	15,00	14,00	12,00
<i>O2 disuelto (ppm)(OD)</i>	6,00	5,00	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<i>% Saturación O2</i>	52,00	40,00	32,00	41,00	41,00	41,00	39,00	37,00
<i>Nitratos (ppm)</i>	5,00	0,00	0,00	3,00	3,00	0,00	0,00	0,00
<i>pH</i>	8	8	8	8	7,5	7	7	6,5
<i>Dureza</i>	440		600	600		640	560	560

Tabla 3.2 .Datos físico químicos del agua del río Henares a nivel de Azuqueca, Alcalá y Torrejón. (1,2, 3) Diferentes puntos de muestreo.

Parámetros/Puntos	Azuqueca		Alcalá			Torrejon
	Az1	Az 2	A1	A2	A3	T1
Turbidez (JTU)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tª agua (°C)	13,00	14,00	11,00	11,00	12,00	12,00
O2 disuelto (ppm) (OD)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
% Saturación O2	38,00	39,00	36,00	36,00	36,00	37,00
Nitratos (ppm)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
pH	8	8	7,00	7,00	8,00	8
Dureza	480	480	520,00	560,00	560,00	480

Analizando los datos obtenidos hay que destacar la elevada dureza que presentan el agua.

Acerca del parámetro de turbidez, no es un agua que presente sólidos en suspensión, es decir tiene alta transparencia.

En el caso del pH se observa el carácter homogéneo que hay a lo largo del perfil del río, siendo neutro o ligeramente básico.

Y por último, respecto al oxígeno disuelto (OD) señalar de una forma general, que se encuentra más concentración de OD en las cabecera del río que en los demás puntos. La toma de los datos físico químicos del río Henares en el municipio de Alcalá se realizó durante los meses de invierno y primavera del año 2010. Mediante mediciones realizadas "in situ" se determinaron los valores de los parámetros del agua: Tª del agua, Tª ambiental y pH. En la tabla 3.3 y 3.4 figuran los datos obtenidos.

Tabla 3.3. Datos físico químicos de las aguas del río Henares a nivel de Alcalá en primavera.

<i>Parámetros/Puntos</i>	Fuente Luis Mariano	Isla de los colegios	Puente Zulema	Salida de la depuradora
<i>pH</i>	5	5	6	5,5
<i>Tª amb (°C)</i>	15	17	15	15
<i>Tª agua (°C)</i>	13	15	13	15

Tabla 3.4. Datos físico químicos de las aguas del río Henares a nivel de Alcalá en otoño.

<i>Parámetros</i>	Fuente Luis Mariano	Isla de los colegios	Puente Zulema	Salida de la depuradora
<i>pH</i>	6	5,5	5	5,5
<i>Tª amb (°C)</i>	3	3	3	3,5
<i>Tª agua (°C)</i>	0,9	1,1	1,1	1,5

3.2. Datos del caudal del río

Al mismo tiempo que se determinaron los datos físico químicos de los diferentes tramos del río, se analizaron los datos proporcionados por la Confederación Hidrológica del Tajo de las estaciones de aforo situadas a lo largo del Henares.

Estos datos se tuvieron en cuenta para discutir los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 3.1)

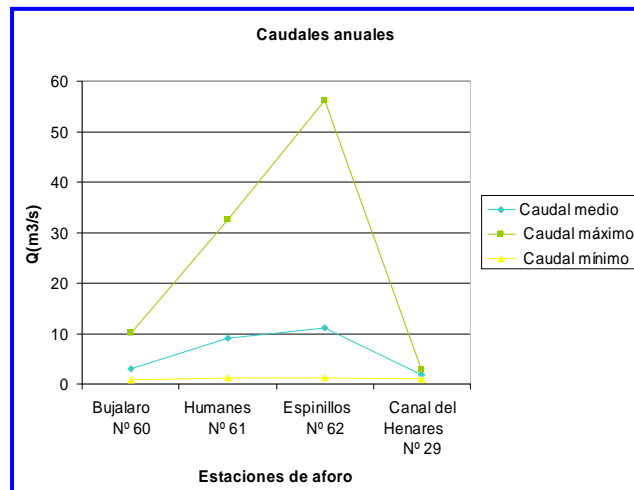


Fig.3.1. Caudales anuales medios, máximos y mínimos de aportación en la serie 2005-2006 (Comisaría de las aguas del Tajo. Confederación Hidrográfica del Tajo)

Puede apreciarse que los caudales medios no varían de forma significativa y los máximos son registrados en la Estación de Nº62 de Espirillos, situada en Alcalá de Henares

3.3. Estudio de la calidad sanitaria del río Henares

La calidad sanitaria del río Henares se valoró midiendo el grado de contaminación fecal en sus aguas. Para ello se determinó la presencia de tres grupos de microorganismos indicadores de contaminación fecal:

- Microorganismos coliformes
- Enterococos
- Clostridios Sulfito Reductores

Durante los meses de otoño del año 2009 se estudió la calidad sanitaria del río Henares tomando como referencia las zonas próximas a las principales poblaciones asentadas en sus orillas. Desde Sigüenza, la más próxima al nacimiento del río, hasta Torrejón de Ardoz, próxima a su desembocadura en el Jarama.

Durante los meses de invierno y primavera del 2010 se realizó el mismo estudio en el río Henares a su paso por la ciudad de Alcalá.

3.3.1 A lo largo del río

o Colimetría

Los resultados de la colimetría de las aguas del río Henares tomadas en las principales poblaciones lindantes durante los meses de otoño se muestran en lo siguiente figura 3.2 de forma conjunta.

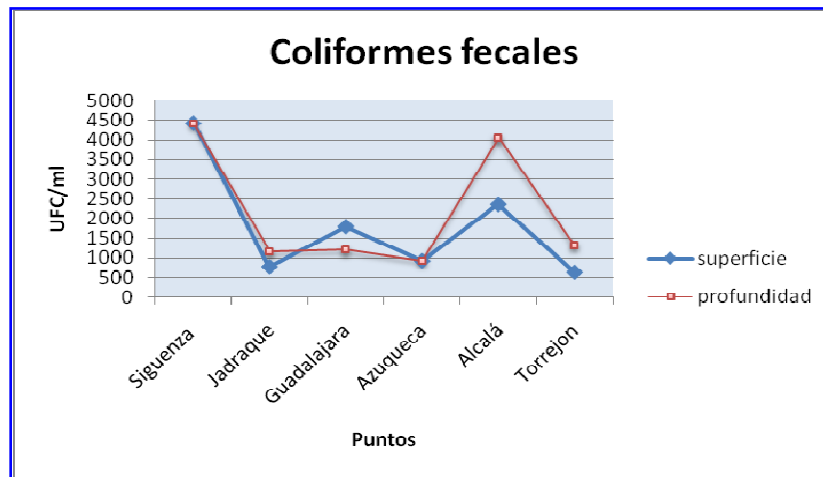


Fig. 3.2. Concentración de bacterias coliformes fecales a lo largo del río Henares.

En dicha figura se aprecia como las concentraciones de este conjunto de microorganismos son máximas en ciudades como Sigüenza, Guadalajara y Alcalá. Disminuyendo a su paso por los municipios intermedios como son Jadraque, Azuqueca y Torrejón.

o **Enterococos y Clostridios Sulfito Reductores**

La tabla 3.5 muestra un resumen de la contaminación fecal a lo largo del río Henares, pudiéndose distinguir los tramos que presentaron mayor contaminación. A estos tramos les denominaremos “puntos calientes” de contaminación fecal.

Tabla 3.5. “Puntos calientes” de contaminación de fecal a lo largo del río Henares. (+) nº de colonias $0 \geq 5$. (++) , nº de colonias $5 \geq 7.5$ y (+++) nº de colonias > 7.5 .

Punto de muestra	Coliformes fecales	Enterococos	Clostridios
Sigüenza 1	+	+	+
Sigüenza 2	+	++	+++
Sigüenza 3	+	+++	+++
Jadraque 1	+	-	++
Jadraque 2	+	+	-
Jadraque 3	+	+	-
Guadalajara 1	+	++	+++
Guadalajara 2	+	+	++
Guadalajara 3	+	+	+++
Azuqueca	+	+	+++
Alcalá 1	+	++	+
Alcalá 2	+	++	+++
Alcalá 3	+	+++	+
Torrejón	+	-	+++

El río Henares presenta su primer “punto caliente” de contaminación fecal a nivel de Sigüenza, pasado el centro de la ciudad y la depuradora. El siguiente “punto caliente” se localiza en Guadalajara antes de pasar por el centro de la ciudad y a la salida de la misma. Por último, el río muestra dos puntos calientes de contaminación fecal, a su paso por el centro y a la salida de Alcalá, después de la depuradora.

3.3.2 A su paso por Alcalá de Henares

o Colimetría

Los resultados de la colimetría de las aguas del río Henares a su paso por Alcalá de forma conjunta en ambas estaciones se representan gráficamente en la figura 3.3

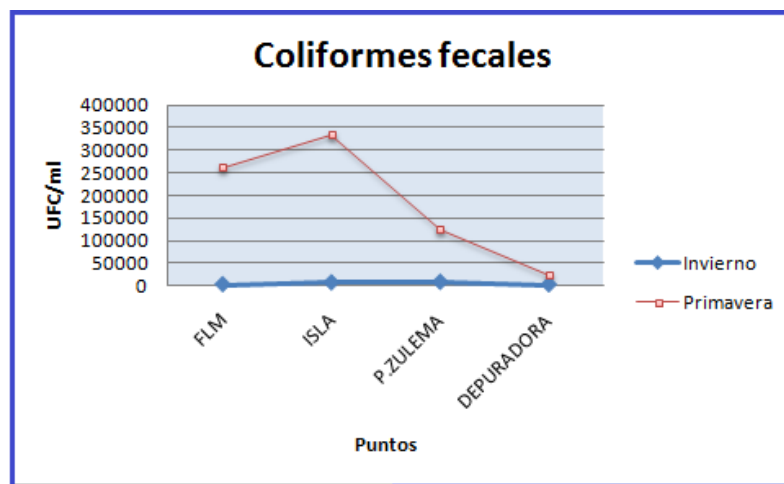


Fig.3.3. Comparación de la concentración de las bacterias coliformes fecales en invierno y primavera.

En las gráficas anteriores se observa una pauta general, es decir, se obtiene más cantidad de bacterias coliformes en primavera que en invierno. En primavera, el máximo de la concentración de bacterias coliformes se encuentra en la Isla de los colegios, sin embargo en invierno se detectó a nivel del Puente Zulema, en el centro de Alcalá. En el punto de la Fuente de Luis Mariano se identificó la presencia de *Citrobacter*, mientras que en todos los otros puntos de muestreo, la bacteria coliforme identificada fue de *E.coli*.

o Enterococos y Clostridios Sulfito Reductores

En la tabla 3.6 muestra un resumen de los datos de contaminación fecal en Alcalá en ambas estaciones. Al igual que se indicó en el apartado 3.1.1, los puntos de muestreo

que presentan mayor grado de contaminación fecal serán denominados “puntos calientes”.

Tabla 3.6. “Puntos calientes” de contaminación fecal del río Henares a su paso por Alcalá en (I) invierno y en (P) primavera. (+) nº de colonias $0 \geq 12.5$. (++) nº de colonias $12.5 \geq 30$. (+++) nº de colonias > 30 .

Punto de muestra	Coliformes fecales	Enterococos	Clostridios
FLM I	+	++	+
FLM P	+	+	+++
La Isla I	+	+	+++
La Isla P	+	-	++
Puente Zulema I	+	+	+++
Puente Zulema P	+	-	+++
Salida depuradora I	+	-	+++
Salida depuradora P	+	++	++

En invierno, el mayor tramo de contaminación fecal del Henares a su paso Alcalá se encuentra en la Isla y en el puente Zulema después de haber pasado por el centro de la ciudad. En primavera, si se consideran los datos de bacterias coliformes (NMP), la contaminación fecal es elevada en todo el tramo del río que pasa por Alcalá, aunque se registran valores más elevados a nivel del puente Zulema.

3.4 Estudio de la flora microbiana del río Henares

Con el objetivo de llegar a conocer la flora microbiana del río Henares, de forma preliminar se analizó una parte de la misma, la integrada por microorganismos planctónicos heterótrofos, ya que la cantidad de estos microorganismos puede ser utilizada como un índice de la calidad ambiental del río. Por un lado, puede indicar el grado de limpieza de las aguas, puesto que suele ser proporcional a la cantidad de materia orgánica biodegradable presente en el agua. Por otro lado, esta comunidad microbiana participa activamente en el proceso de biodegradación de contaminantes orgánicos y por tanto en el proceso de autodepuración de los ríos.

Para analizar la comunidad de microorganismos heterótrofos, se determinó la concentración de microorganismos aerobios mesófilos, la de pseudomonas y la de hongos en las aguas del río Henares.

Como ya se ha indicado en el apartado 3.1, durante los meses de otoño del año 2009 se estudió la flora microbiana del río Henares tomando como referencia las zonas próximas a las principales poblaciones asentadas en sus orillas y durante los meses de invierno y primavera del 2010 se realizó el mismo estudio en el río Henares a su paso por la ciudad de Alcalá.

3.4.1 A lo largo del río

○ Aeróbios mesófilos

Los valores de la concentración de microorganismos aerobios mesófilos de las aguas del río Henares tomadas en las principales poblaciones lindantes durante los meses de otoño se muestran de forma conjunta, estos resultados se representan gráficamente en la figura 3.4.

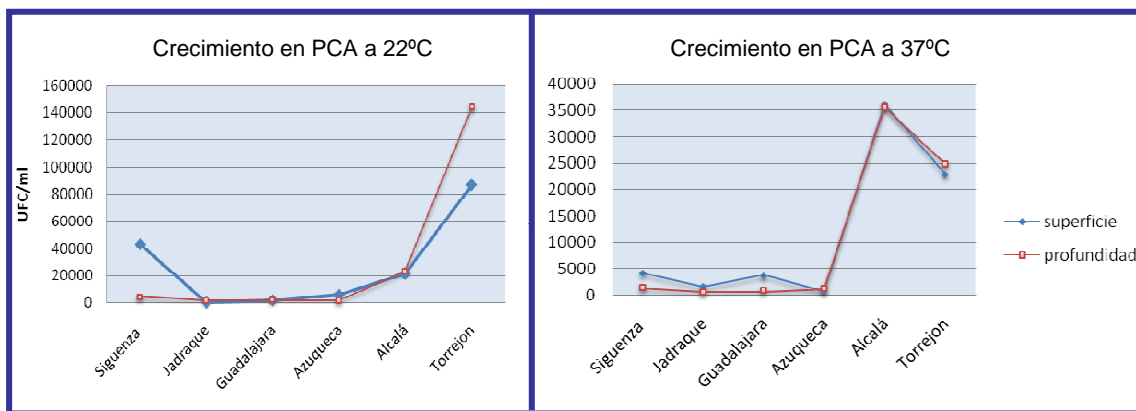


Fig.3.4. Variación de la concentración de microorganismos mesófilos a lo largo del río Henares.

Los microorganismos aerobios heterótrofos que crecen a 22°C posiblemente representan la fracción de microorganismos autóctonos del río, adaptados a vivir a temperaturas más bajas. Los microorganismos que crecen a 37°C serían aquellos capaces de crecer en un rango más amplio de temperaturas o, probablemente, aquellos microorganismos alóctonos que llegan al río junto con los vertidos del exterior. La concentración de microorganismos que crecen a 22°C es mucho mayor de la de los que crecen a 37°C. En ambos casos, la mayor densidad de microorganismos parece coincidir con una mayor densidad de contaminación fecal a nivel de la ciudad de Alcalá.

○ **Pseudomonas**

La concentración de pseudomonas en las aguas del río Henares tomadas en las principales poblaciones lindantes durante los meses de otoño se muestran en la figura 3.5 para obtener un perfil de la concentración de pseudomonas a lo largo del río Henares.

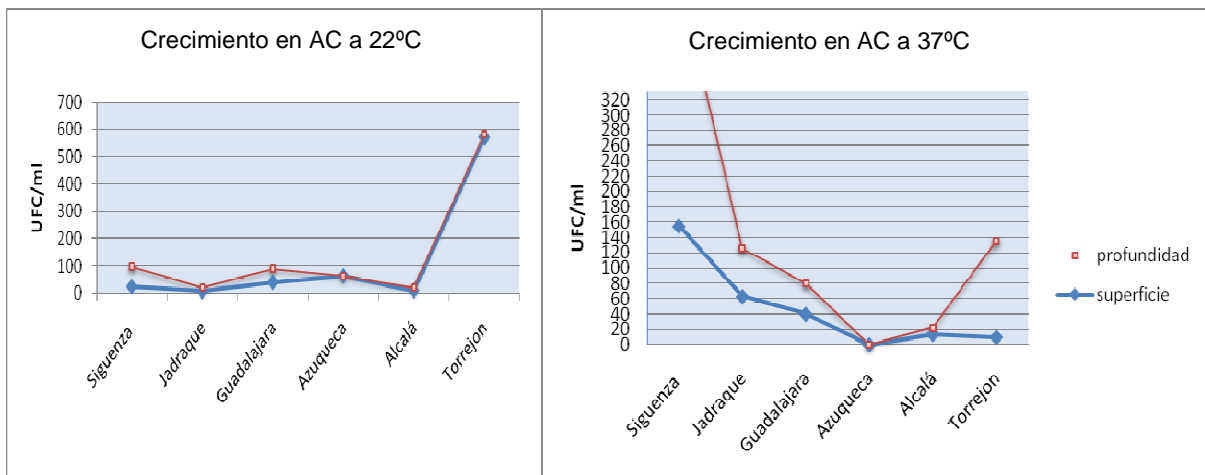


Fig. 3.5. Variación de la concentración de pseudomonas a lo largo del río Henares.

Si consideramos que las bacterias del grupo de las pseudomonas que crecen a 22°C representa la fracción de pseudomonas autóctonas, se puede observar que éstas predominan únicamente en el último tramo del río.

○ **Hongos**

La concentración de hongos y levaduras en las aguas del río Henares tomadas a nivel de las principales poblaciones durante los meses de otoño se representan gráficamente en la figura 3.6.

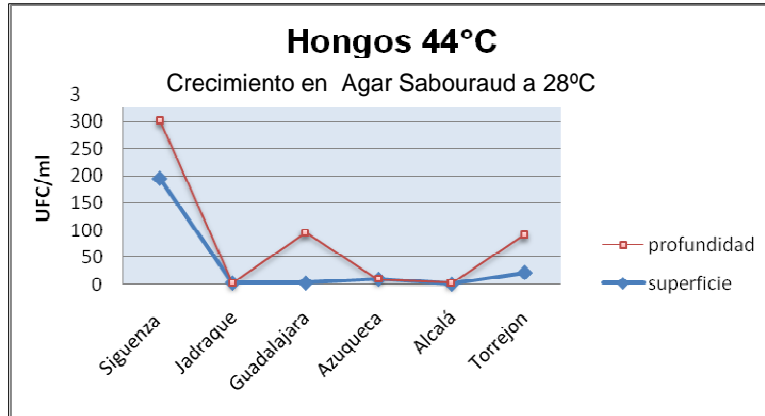


Fig. 3.6. Variación de la concentración de hongos y levaduras a lo largo del río Henares.

Analizando dicha figura, se perciben las oscilaciones de la concentración de hongos y levaduras a lo largo del río, teniendo su máximo en Sigüenza seguido de Guadalajara y Torrejón de Ardoz.

3.4.2 A su paso por Alcalá de Henares

- **Aeróbios mesófilos**

Los valores de la concentración de microorganismos aerobios mesófilos de las aguas del río su paso por Alcalá de Henares los meses de invierno y primavera se muestran gráficamente en la figura 3.8.

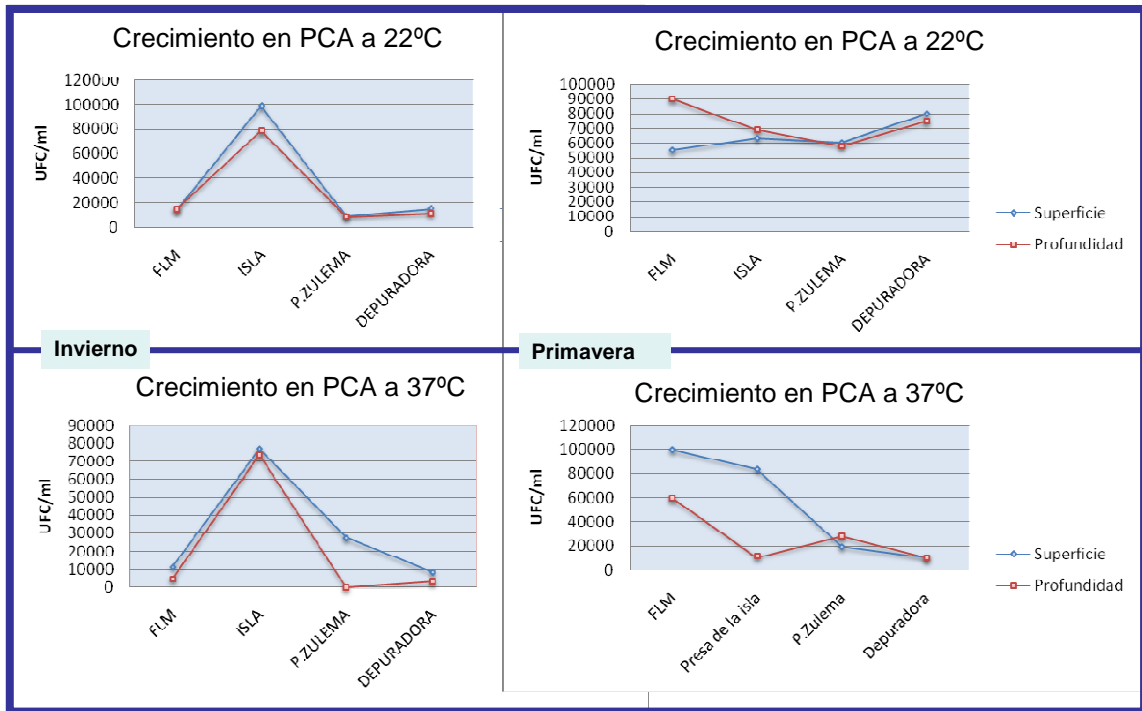


Fig. 3.8 Variación de la población de microorganismos mesófilos del río Henares a su paso por Alcalá entre los meses de invierno y primavera.

Se puede ver una pauta general, es decir, se obtiene más cantidad de estos grupos de microorganismos en primavera que en invierno.

Los organismo heterótrofos aerobios, como se puede apreciar en las figura 3.8., siguen la misma pauta a ambas temperaturas de crecimiento en la época de invierno. La tendencia es que antes de llegar a la ciudad su concentración es mínima y que según el río atraviesa la ciudad, la cantidad aumenta hasta llegar a la depuradora, donde se aprecia de nuevo un valor mínimo.

En primavera, la población de heterótrofos mesófilas que crecen a 22°C es muy alta a su paso por Alcalá, lo que coincide con valores elevados de contaminación fecal. Sin embargo, los microorganismos que crecen a 37°C, aunque presentan valores altos a la entrada de Alcalá, van siendo eliminados en su recorrido hasta la depuradora.

○ **Pseudomonas**

Los valores de la concentración de bacterias pertenecientes al grupo de las pseudomonas en las aguas del río su paso por Alcalá de Henares los meses de invierno y primavera se representan gráficamente en la figura 3.9

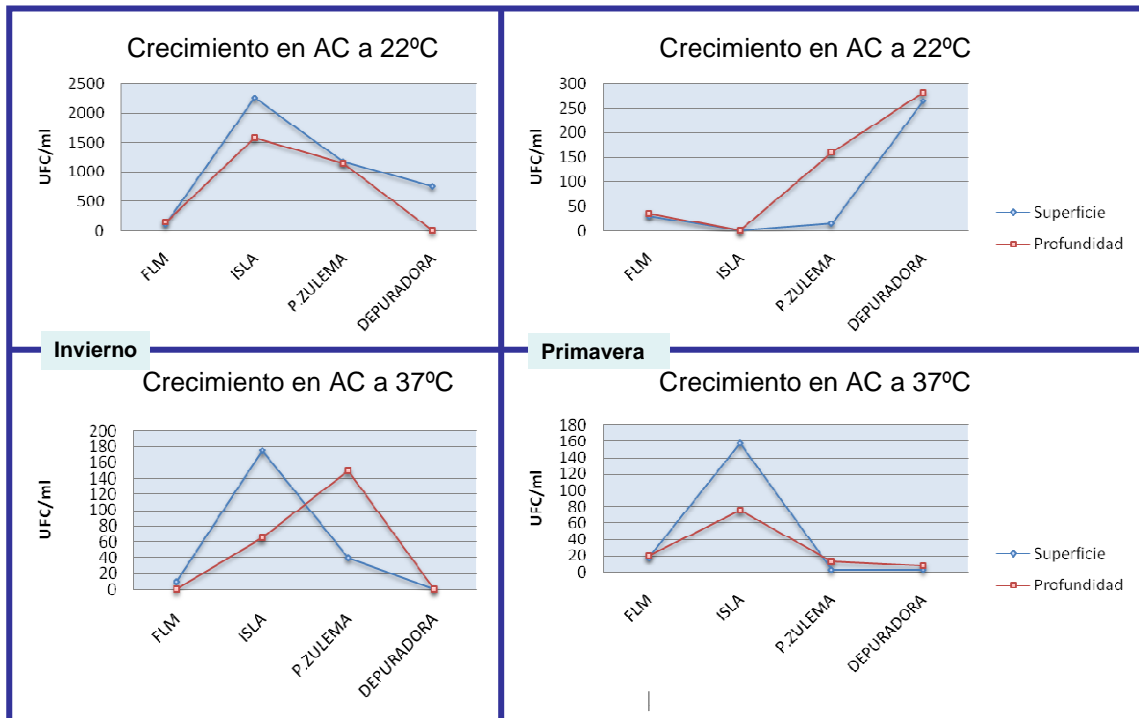


Fig 3.9. Variación de la población de pseudomonas del río Henares a su paso por Alcalá entre los meses de invierno y primavera.

Tanto en invierno como en primavera, se puede apreciar que la máxima de concentración de pseudomonas se encuentra en La Isla de los Colegios, tramo del río que discurre por el centro de la ciudad.

○ **Hongos y levaduras**

Los valores de la concentración de poblaciones de hongos y levaduras en las aguas del río su paso por Alcalá de Henares los meses de invierno y primavera se representan gráficamente en la figura 3.10.

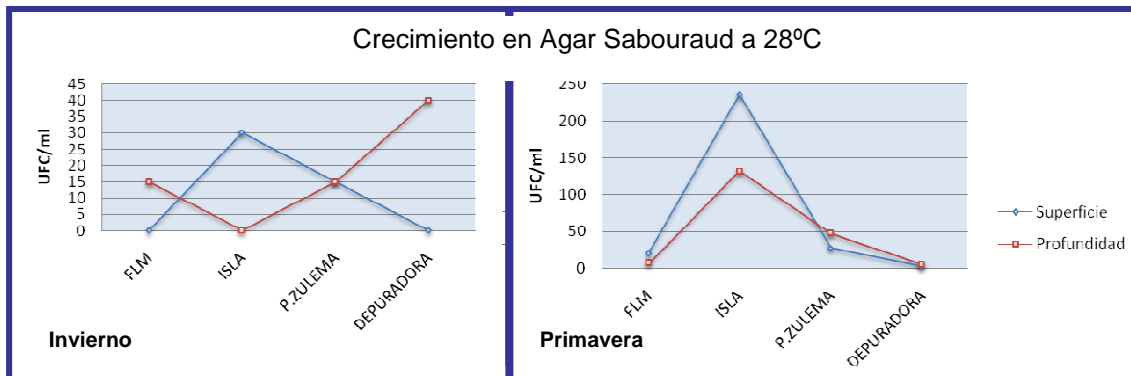


Fig. 3.10 . Variación de la población de hongos y levaduras del río Henares a su paso por Alcalá entre los meses de invierno y primavera.

Tanto en invierno como en primavera, se puede apreciar que la máxima de concentración de hongos se encuentra en La Isla de los Colegios, tramo del río que discurre por el centro de la ciudad.

3. 5. Identificación de la flora microbiana del río Henares

A partir de las colonias aisladas de microorganismos en diferentes medios de cultivo y en diferentes puntos de muestreo del río, se obtuvieron cultivos puros de bacterias, mohos y levaduras. Para conocer la flora microbiana del río Henares, algunos de estos microorganismos aislados fueron identificados. Se seleccionaron aquellos microorganismos que presentaban alguna característica peculiar como el color de las colonias, la morfología o el haber sido aislados simultáneamente a diferentes niveles del río.

En este trabajo se han identificado dos especies de bacterias, una especie de levadura y, a nivel de género, tres hongos cuyas características se describen a continuación.

a) Bacterias

Se identificaron dos bacterias habitantes de las aguas del río Henares. Ambas bacterias presentaron algunas características comunes como la de ser bacilos Gram negativos, móviles, oxidativos y catalasa positivos. Se analizaron las características bioquímicas de ambas bacterias mediante galerías API 20 NE de Biomerieux y los resultados de estas pruebas se sometieron al programa *api web™* para su identificación. Según este programa, una de las bacterias fue

identificada como *Pseudomonas putida*, con un intervalo de confianza del 99,6% y la otra bacteria fue identificada como *Sphingomonas paucimobilis* con un intervalo de confianza del 71,7%.

Imágenes del aspecto de las colonias y la morfología celular de *Pseudomonas putida* y se muestran en las figuras. 3.11.

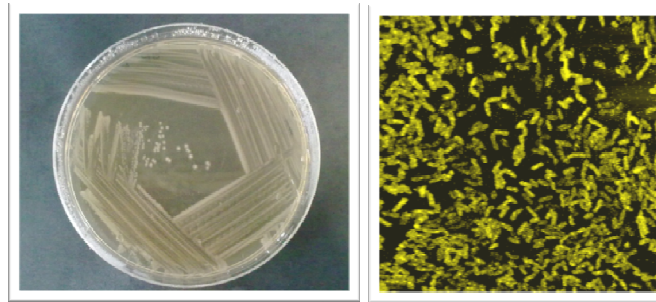


Fig. 3.11 a) Crecimiento en placa de PCA de *Pseudomona putida*. b) Imagen de un biofilm de *Pseudomonas putida* tomada mediante a microscopía de fuerza atómica (AFM) en la que se observa la morfología de las células. 40 x 40 micrones. (SCANNING PROBE MICROSCOPY)

Identificación de Hongos

a. Levaduras

De las aguas del río Henares se aislaron diversas levaduras en medio Sabouraud con antibiótico. Una de las levaduras aisladas fue identificada como *Candida parasilopsis*. Para la identificación, se utilizaron criterios macroscópicos como el aspecto de las colonias crecidas en Sabouraud, criterios microscópicos como la morfología celular y criterios bioquímicos como la asimilación de sustratos orgánicos mediante el sistema API 20 C AUX.

Candida parasilopsis fue aislada en las aguas del río después del vertido de la depuradora. Cuando crece en medio Sabouraud forma colonias de color crema, opacas, elevadas y mantecosas. *C. parasilopsis*, observada al microscopio, muestra dimorfismo celular, pudiéndose apreciar formas ovaladas y esféricas que forman cadenas y se dividen mediante gemación. También es posible distinguir el desarrollo de un verdadero pseudomicelio.

○ **Hongos filamentosos**

En las aguas del Henares se detectaron tres géneros de hongos: *Penicillium*; *Aspergillus* y *Cladosporium*. La identificación de estos hongos se basó en la forma y color de las colonias crecidas en Agar Sabouraud y en la morfología de las hifas, de los conidios y de los conidióforos observados al microscopio mediante tinción vital con azul de lactofenol. En las figuras 3.12 y 3.13 se muestran fotografías del aspecto de las colonias y de los conidióforos de los tres hongos respectivamente.

Las colonias de *Penicillium* son circulares con un borde neto de color blanco. La superficie de la colonia es aterciopelada y ligeramente algodonosa.

Al microscopio se observa que *Penicillium* posee conidios redondos generados en una estructura ramificada en forma de pincel, el conidióforo, que termina en cadenas de conidios.

Cuando crece en medio Sabouraud, *Aspergillus* forma un micelio de color rosado y superficie aterciopelada. Microscópicamente se detecta la formación de hifas tabicadas y de conidios redondos. Largas cadenas de conidios son generadas en una célula

conidiógena ensanchada, la vesícula.

Cladosporium crece formando colonias de color marrón oscuro y de aspecto aterciopelado. Las hifas son tabicadas; los conidios, de forma ovalada, son oscuros y forman cadenas.

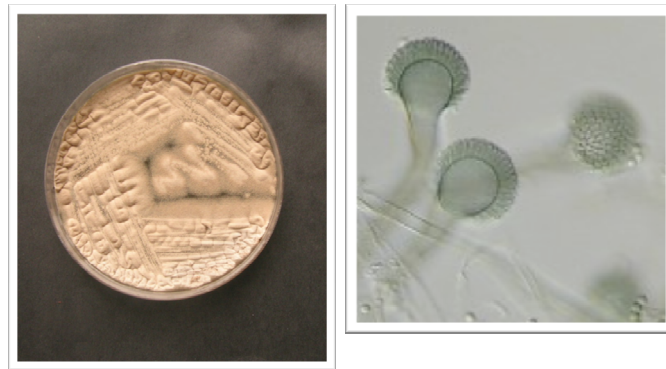


Fig.3.12 a) Cultivo de *Aspergillus* sp en agar Sabouraud. b) Conidióforos (x400)

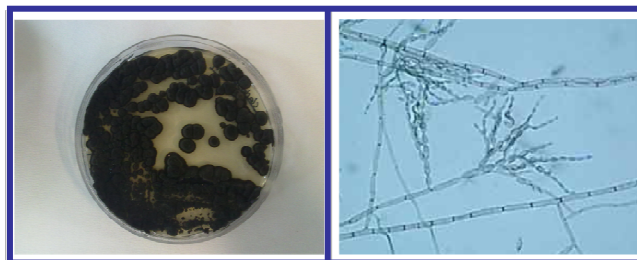


Fig.3.13 a) Cultivo de *Cladosporium* sp en agar Sabouraud. (Elaboración propia) b) Hifas y conidios conidios que forman cadenas (William McDonald, M.D. 2001).

4. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran distintos aspectos de la calidad de las aguas del río Henares a su paso por las poblaciones más importantes que atraviesa y de las que recibe diversos tipos de vertidos.

En primer lugar, centrándonos en el análisis del perfil general del río, desde su nacimiento en la Sierra Ministra hasta su desembocadura en Mejorada del Campo, se obtuvieron los siguientes resultados:

Respecto a los parámetros físico-químicos del río cabe destacar la elevada dureza del agua, con un rango de 300-600 mg/l. El agua del Henares entra dentro de la clasificación de agua muy dura y no es aceptable como agua potable ya que el límite máximo permisible es de 300 mg/l (RD.140/2003). Estos valores resultan normales en la cuenca dada su geología.

Acerca del parámetro turbidez, el agua tiene una elevada transparencia y no presenta elevadas cantidades de sólidos en suspensión. Su máxima turbidez se encuentra en los puntos más altos, posiblemente porque la velocidad del río es mayor y arrastra más sedimentos; y también se encuentra en el municipio de Guadalajara, ya que es la primera ciudad que aporta gran cantidad de vertidos al río.

En cuanto al pH, se observa el carácter homogéneo que hay a lo largo del perfil del río, siendo neutro o ligeramente básico por el material calcáreo por el que discurren las aguas. Aún así, es adecuado para el desarrollo de los organismos acuáticos (Informe sobre el Estado de conservación del río Henares 2009).

Y por último, respecto al oxígeno disuelto (OD) hay que destacar que la mayor concentración se encuentra en la cabecera del río, debido a la mayor velocidad y menor

temperatura del agua de un río que acaba de nacer. Esta concentración disminuye ligeramente según el río se acerca a los grandes municipios como Guadalajara y Alcalá. Por lo tanto, como es natural, el Henares posee un agua más limpia en los tramos superiores.

Considerando los parámetros biológicos analizados en el río Henares a lo largo de su recorrido, se discutirán en primer lugar los resultados del análisis de la calidad sanitaria del agua, es decir, de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

Los microorganismos indicadores de contaminación fecal nos permiten conocer si el agua contiene o ha contenido residuos fecales que pudieran albergar microorganismos patógenos para el hombre y por lo tanto ser un vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas.

La valoración de bacterias coliformes es una buena medida de la contaminación fecal en nuestra zona geográfica. La comparación de la colimetría con la contaminación por enterococos sirve para determinar si la contaminación fecal tiene un origen humano o animal. Valores de la relación Coliformes/Enterococos superiores a 4 serían debidos a contaminación humana mientras que valores inferiores a 0.7 indicarían una probable contaminación de origen animal (Maier, R. et al, 2001). La presencia de clostridios sulfito reductores en el agua, junto con bajos valores en la colimetría podría indicar una contaminación fecal antigua (CYTED,2006).

Al determinar los microorganismos indicadores de contaminación fecal, se aprecia que las aguas del río Henares están contaminadas desde su inicio a su paso por

Sigüenza, hasta su desembocadura y además, que esta contaminación es actual. Dados los bajos recuentos de enterococos en el medio KF, se podría añadir que la contaminación fecal es, mayoritariamente, de origen humano, siendo *Escherichia coli* la bacteria coliforme fecal identificada en todos los tramos del río. A la salida de Sigüenza, donde se asientan algunas granjas de ganado vacuno y bovino, se registró mayor densidad de enterococos que en otras zonas.

Hay tres puntos en el río Henares que muestran mayores grados de contaminación fecal, Sigüenza, Guadalajara y Alcalá. Aunque en Sigüenza hay una planta depuradora, parece ser que no funciona adecuadamente y ya están en marcha los trámites necesarios para la construcción de una nueva.

Guadalajara y Alcalá son dos ciudades que vierten un gran volumen de aguas residuales al río debido a que están muy pobladas e industrializadas. En Guadalajara, aunque hay una EDAR, el control de vertidos industriales hacía el río no es muy riguroso y se sabe que hay industrias que vierten sin ningún tipo de tratamiento (Informe sobre el estado de conservación del río Henares, 2009). En la ciudad de Alcalá existe una depuradora de aguas industriales y otra de aguas urbanas que aportan un caudal extra de agua al río. La reducción de la contaminación fecal en el tramo posterior al vertido de las depuradoras

puede ser debida a un efecto de dilución por los aportes de agua depurada libres de contaminación fecal.

Hay que decir que la depuradora de Azuqueca, de reciente construcción, también cubre bastante bien las necesidades de depuración de este municipio.

Los resultados del análisis de contaminación fecal indican que la calidad sanitaria del río Henares no es buena y que el río puede ser un vehículo transmisor de enfermedades infecciosas si sus aguas son utilizadas para el ocio, recreo y regadío entre otros usos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que éste es un trabajo preliminar, y habría que hacer más análisis en localizaciones más concretas y de forma más frecuente.

Como se ha explicado en el apartado de resultados, para conocer la flora microbiana del río Henares se determinó la densidad de microorganismos planctónicos heterótrofos en el agua, desde Sigüenza hasta Torrejón. La abundancia de estos microorganismos es proporcional a la cantidad de materia orgánica presente en el agua. Cuando el río recibe un aporte de materia orgánica, los microorganismos heterótrofos la degradan para obtener energía y nutrientes para el crecimiento, por lo que sus poblaciones aumentan de tamaño.

Una vez eliminada la materia biodegradable del vertido, el crecimiento microbiano disminuye porque se acaba su fuente de alimento. Por lo tanto, se puede decir que una mayor densidad de la población de heterótrofos aerobios indica una mayor cantidad de vertidos orgánicos en las aguas del río y una mayor actividad biodegradadora.

El recuento de bacterias mesófilas aerobias se realizó inoculando muestras de agua en un medio de cultivo general como el PCA que se incubó a 22 y a 37°C. En este ensayo se esperaba que los microorganismos que crecen a 22°C fueran predominantemente aquellos que forman parte de la flora autóctona del río, adaptados a vivir a una temperatura mas fría. Sin embargo, a 37°C crecerían, no sólo algunos mesófilos del río, sino también microorganismos que pudieran haber llegado al río junto con los vertidos. Esta incubación a temperaturas diferentes se llevó a cabo también con el medio Agar Cetrimida, específico para *Pseudomonas*.

Considerando los microorganismos mesófilos aerobios (crecidos a 22 y 37°C), se observa un aumento progresivo de éstos en el agua, según el río avanza hasta la desembocadura.

Si se determinan los valores medios de mesófilos aerobios registrados en cada punto del río y se comparan con los obtenidos en el análisis de indicadores de contaminación fecal, se comprueba que los picos de mayor densidad de esta población microbiana coinciden con los puntos de mayor contaminación fecal, es decir, en el río a su paso por Sigüenza, Guadalajara y Alcalá. Este estado puede deberse a los aportes de aguas residuales de los municipios por los que atraviesa el río.

Los microorganismos mesófilos se encuentran tanto en el suelo como el agua, por lo que su presencia no muestra una situación anómala. Lo que sí sorprende es la gran cantidad de UFC/ml que se aprecia a partir de Alcalá. Un aumento de las mismas, no acompañado de otro tipo de bacterias, puede indicar una deficiente desinfección del agua y por lo tanto de un estado deficitario de la calidad del río (Acosta, 2008).

El punto de mayor concentración de microorganismos mesófilos aerobios encontrado en Alcalá, seguramente se debe al aporte de vertidos no autorizados de algunas industrias. Desde este punto, el río lleva aguas abajo una gran cantidad de microorganismo mésofilos.

La variación en la densidad de las poblaciones de pseudomonas y de hongos en las aguas del río no sigue el mismo patrón que la de los microorganismos mesófilos, por lo que los cambios en estas poblaciones microbianas no están ligados a los vertidos de aguas residuales, aunque evidentemente también les afecte (Lapeña 1982).

El estudio de bacterias heterótrofas oxidativas como las que pertenecen al grupo de las pseudomonas ha de ser revisado, y posiblemente requiera la toma de mayor número de muestras y la utilización de otros medios de cultivo (Holden ,1970).

Aparentemente, la población de hongos tiene una densidad máxima en Sigüenza y disminuye a lo largo de río hasta llegar a Alcalá. Se podría pensar que los parámetros físico químicos de las zonas altas del río son más favorables para el crecimiento de los hongos, sin embargo, los valores de pH y OD son bastante homogéneos a lo largo del río.

Los microorganismos que constituyen la flora autóctona, que se puede encontrar tanto en el suelo como el agua sin necesidad de que haya vertidos, se ha comprobado que aumentan con éstos y pueden llegar a ser indicadores de contaminación indirectos.

En resumen, a lo largo del perfil río nos encontramos con una contaminación marcada por los grandes aportes de vertidos de los municipios de mayor tamaño y por la falta de control de los mismos. Esto provoca que el río no pueda autodepurar estos vertidos o que el tratamiento de algunas depuradoras no sea suficiente.

En segundo lugar se analizó la calidad sanitaria y se estudió la flora autóctona del río Henares a su paso por Alcalá durante las estaciones de invierno y primavera. Los resultados obtenidos en este apartado se discuten a continuación:

En esta parte del trabajo, únicamente se midió el pH y la temperatura del agua como parámetros físico químicos. Observando que el pH en estos tramos era más ácido y la temperatura más elevada respecto a la estudiada en el perfil general del Henares posiblemente por la naturaleza de los vertidos que se arrojan al río.

Respecto la calidad sanitaria del río a su paso por el municipio de Alcalá de Henares, los datos que se obtuvieron nos indican lo siguiente:

En cuanto al análisis de microorganismos indicadores de contaminación fecal, coliformes, enterococos y clostridios sulfito reductores, en el municipio de Alcalá se puede ver una pauta general, es decir, hay más cantidad de estos grupos de microorganismos en primavera que en invierno. Esto se corresponde, sin duda, a la diferencia de temperatura, ya que el incremento de temperatura y la disminución del caudal del río en primavera provocan un aumento en la concentración de los mismos. Ya que la supervivencia de los indicadores de contaminación fecal en el agua del río será mayor a mayor temperatura.

Sin embargo, existe una clara diferencia en la localización de las concentraciones máximas de microorganismos indicadores de contaminación fecal en ambas estaciones. Independientemente de la estación, hay un pico de contaminación fecal entre la Isla de los Colegios y el puente Zulema. Se puede afirmar que dicho tramo es, sin duda, el que más aporte de vertidos recibe al pasar por una ciudad industrializada, como es Alcalá. Como se ha comentado en otros apartados, algunas fábricas de Alcalá vierten de forma ilegal al río.

En un trabajo anterior (Arcos y col. 2005), se confirmó la presencia de coliformes totales en estas aguas pero sin identificar el origen. En nuestros análisis se ha identificado la bacteria coliforme fecal presente en el río Henares como *Escherichia coli*. A la altura de la fuente de Luis Mariano y en primavera se detectó *Citrobacter*, considerada como coliforme total porque puede ser habitante, no sólo del intestino del hombre, sino también del agua y del suelo.

Para obtener unas interpretaciones más específicas de este análisis se estudió el comportamiento de los otros dos tipos de indicadores de contaminación fecal.

Respecto a los clostridios la tendencia es clara, en el tramo antes de llegar a la ciudad estas bacterias son mínimas, según el río atraviesa los puntos del centro del municipio, la cantidad se dispara, disminuyendo a su paso por la depuradora. La propia autodepuración del río lo elimina de forma natural.

Respecto a los enterococos, se observa que es máximo en la zona de la depuradora, en la estación de primavera. La presencia de los mismos indica que hay origen de contaminación fecal de origen animal.

Resumiendo, tanto en invierno y como en primavera, se observa la presencia de contaminación fecal en las aguas del río Henares a su paso por Alcalá y su origen puede ser tanto de humano como animal. Por esta razón, consideramos que las aguas del río no son apropiadas para usos tales como el baño o el regadío.

Ahora bien, respecto los datos obtenidos en el estudio de la flora autóctona del río se observó lo siguiente:

Las poblaciones de microorganismos aerobios mesófilos siguen la misma pauta en invierno y en primavera. La tendencia es que en el tramo antes de llegar a la ciudad su

concentración en el agua es pequeña pero va aumentando a medida que el río atraviesa la ciudad y vuelve a disminuir al paso por la depuradora.

Al igual que los coliformes, la concentración de microorganismos mesófilos aerobios presenta un máximo en el tramo comprendido entre la Isla de los Colegios y el Puente Zulema. Esta mayor densidad de microbiana en esta zona ocurre también con las poblaciones de los otros microorganismos heterótrofos biodegradadores, pseudomonas y hongos.

Un recuento elevado de microorganismos heterótrofos aerobios muestra síntoma de una elevada contaminación, o por el contrario, una disminución de la capacidad autodepurativa del río, debido a una gran cantidad de vertidos ajenos al mismo. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que en este análisis no se detectan los microorganismos anaerobios estrictos por lo tanto, los valores obtenidos seguramente sean inferiores a los reales (Lapeña, 1984).

Las pseudomonas son parte habitual de la microflora del suelo. Informan sobre procesos de degradación de la calidad del agua. Son microorganismos claves en el reciclado de materia orgánica en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas, jugando, por tanto, un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental.

En la identificación de bacterias del río Henares cabe destacar que no se encontraron microorganismos patógenos, sino microorganismos quimioorganotrofos conocidos por su elevada actividad como biodegradadores. Tal es el caso de *Pseudomonas putida*. Esta bacteria es móvil por la presencia de uno o más flagelos, es catalasa positiva, oxidasa positiva y no forma esporas. Es Gram negativa y con forma de bacilos rectos. No es patógeno.

P. putida, es una de las cepas de mayor interés industrial entre las bacterias del género *Pseudomonas*, ya que unido a su potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas. En medio acuático forma biopelículas y así participa en la función de depuración del río.

De las aguas de Sigüenza y de Alcalá se aisló en medio PCA una bacteria que formaba colonias de color morado. La bacteria era un bacilo Gram negativo con metabolismo quimioheterótrofo oxidativo, que era además oxidasa y catalasa positivo. Mediante las pruebas bioquímicas API 20 NE esta bacteria fue identificada como *Shingomonas paucimobilis*. Sin embargo, esta bacteria forma colonias de color naranja y no morado por lo que pensamos que nuestro aislamiento puede ser otra bacteria diferente. Existen varios grupos de bacterias que forman colonias de color morado debido a que sintetizan un colorante no difusible que es la violaceína. Este pigmento es importante porque tiene actividad como antibiótico frente a amebas y tripanosomas. De entre las bacterias productoras de violaceína, *Janthinobacterium lividum* es la que presenta unas características fenotípicas semejante a nuestro aislamiento, por lo que podría tratarse de esta bacteria.

Tanto *Sphingomonas* como *Janthinobacterium* se distribuyen extensamente en la naturaleza habiéndose aislado de diferentes hábitats terrestres y acuáticos. Algunas de las *Sphingomonas* (especialmente *Sphingomonas paucimobilis*) causan enfermedades en los seres humanos, principalmente infecciones hospitalarias que típicamente son tratadas fácilmente con antibióticos. Debido a sus capacidades biodegradantes y biosintéticas, las *Sphingomonas* se han utilizado en un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas, como en la biorremediación de contaminantes ambientales.

En medio Saboraud se aisló una levadura que fue identificada mediante galerías API 20 AUX como *Cándida parapsilosis*. Esta levadura desarrolla colonias de color crema, opacas y elevadas y miden de 1 -3 mm. A diferencia de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* no es un patógeno humano obligado, habiendo sido aislado de fuentes no humanos como animales domésticos, insectos o suelo. *Cándida parapsilosis* es también un comensal humano normal y es uno de los hongos con más frecuencia aislados de las manos. Al microscopio se observa una forma dimorfa, con células de morfología oval y otras esféricas, que forman cadenas y se dividen por gemación. También se observa el desarrollo de un verdadero pseudomicelio, característica útil para distinguirla de otros géneros fúngicos (Pumarola, 1995).

Cándida parapsilosis se puede encontrar en hábitats florales, en lago de agua dulce, así como en ríos y arroyos, son levaduras que aparecen asociadas a materia orgánica foránea, por lo que se las considera miembros a los alóctonos de esos ecosistemas. Esta levadura, puede ir asociada a los restos de las plantas muertas que van a parar a los ríos y lagos; cuando sus materiales se han degradado desaparece. Es considerada una de las especies de levaduras más frecuentes en los ríos.

De las aguas del río Henares se aislaron e identificaron tres géneros de hongos filamentosos:

Penicillium

Este género de hongo, procede del suelo y ocasionalmente se puede encontrar en aguas dulces. Se implanta en la materia orgánica en descomposición, atacando a los hidratos de carbono.

Es frecuente en aguas residuales o en aguas contaminadas por está, por lo que se puede señalar que el Henares tiene una calidad baja.

También se puede encontrar en el proceso de lodos activos, en el tratamiento secundario de aguas residuales durante el periodo de almacenamiento en los tanques de aireación, mineralizando una parte de los sustratos orgánicos disueltos y convirtiendo en biomasa fúngica otra parte. El crecimiento excesivo de hongos en este sistema de tratamiento secundario, provoca una sedimentación escasa como consecuencia del "espojamiento" de los flóculos.

Aspergillus

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena. Son microorganismos heterótrofos considerados estrategas de la R por su rápida colonización y degradación de altas concentraciones de materia orgánica (Andrews y Hall, 1986). Son mohos osmotolerantes. Tienen una actividad intermitente, con periodos inactivos de reposo. Son hongos aislados con mayor frecuencia de los suelos. *Aspergillus* spp. es un hongo con gran presencia en la naturaleza. Se encuentra fácilmente en el suelo, en el agua y en los restos vegetales. Por lo que se puede afirmar que su presencia se debe a la flora autóctona del propio río.

Cladosporium

Cladosporium es un género de hongos que incluye algunos de los mohos más comunes. Las esporas de *Cladosporium* son dispersadas por el viento y con frecuencia son extremadamente abundantes en el aire exterior y donde haya humedad.

Existen especies que producen colonias de color verde oliva, de color negro o marrón. Tienen conidios oscuros que forman cadenas simples o ramificadas

Las especies de *Cladosporium* se encuentran comúnmente en el material vegetal vivo y muerto, siendo algunas patógenas de plantas. Es el género con mayor valor ecológico (Tipismana et al, 2005).

Presenta gran tolerancia a condiciones ambientales, por lo que suele presentarse en grandes densidades en el ambiente.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de este proyecto nos llevan a concluir:

1. Los niveles de los parámetros físico químicos que presenta el río Henares le hacen ser un agua no apta para el consumo humano, sin embargo es un agua que sí cumple los requisitos ambientales para el crecimiento de flora y fauna en el río.
2. En el estudio microbiológico se pone de manifiesto la presencia de contaminación fecal en todos los tramos analizados, así como la presencia de la bacteria coliforme *Eschericia Coli*. La contaminación fecal es de origen humano principalmente.
3. Del mismo modo se establece que los municipios que presentan más contaminación a lo largo del río son: Sigüenza, Guadalajara y Alcalá de Henares.

4. Se determina que la eficacia de la depuradora situada en Sigüenza no es suficiente para el tratamiento de las aguas y por tanto las aguas del río pasada estas instalaciones superan los límites establecidos legalmente en el reglamento de las aguas potables. Sin embargo, el poder autodepurativo del río hace disminuir la contaminación. Respecto al rendimiento de las depuradoras de Alcalá, Guadalajara y Azuqueca se puede afirmar que es efectivo.

5. El río Henares presenta mayor contaminación en el tramo que coincide con el centro de Alcalá. Se observa una pauta general, es decir, se detecta mayor concentración de microorganismos en primavera que en invierno.

6. En el río Henares se han identificado microorganismos autóctonos y biodegradadores que participan en el proceso de autodepuración. Así como microorganismos propios de vertidos.

7. No se han identificado microorganismos patógenos, sino microorganismos que pueden ser autóctonos o propios de vertido en los tramos estudiados. No obstante, la calidad sanitaria del río Henares no es buena y el río puede ser un vehículo transmisor de enfermedades infecciosas si sus aguas son utilizadas para el ocio, recreo y regadío entre otros usos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Acaso E., Martín –Loeches M., Moya E., Ruiz B. y Calonge A. 2007.** Geología y geomorfología del campus. 1ª Edición. Edita Universidad de Alcalá .ISSN:1885-625X.
- **Agudo A. J, 2010.** El agua es vida. Blogs Madrid +d [Ref.19Abril, 2010]. Disponible en Web< <http://www.madrimasd.org> >.
- **Almenar V.S., Vandevenne C.A., Viña A.I., Sala N. y Torres M., 1997.** Prácticas microbiología de alimentos. 1ª Edición. Edita Universitat de Lleida. ISBN:84-89727-40-6.
- **Arcos Pulido M. del P., Lilia S., Estupiñán S .M, Torres MSc. y Gómez Prieto C., 2005** .Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua División de Investigaciones. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- **Atlas R. D y Bartha R., 2001.** Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª Edición. Editorial Pearson Educación, S.A. ISBN: 84-7829-039-7.
- **APHA, AWWA, WPCF, 1975.** Standard methods for the examination of water and wastewater. 14 Th editions. American public health association. Washington.
- **Brock, Thomas D., Madigan T, Martiko M. y Parker J., 2003** Biología de los microorganismos. 10ª edición. Editorial Pearson Addison Wesley. ISBN:9788478290970.

- **Camargo J A y col. (Ed.) ,2006.** Ecología y conservación del río Henares y sus atributos. Ed. Universidad de Alcalá de Henares. ISBN 84-461-4267-5.
- **Calvo D., Molina T. y Salvachúa J, 2001.** Ciencias de la tierra y medio ambiente. 1ª Edición. Editorial Mc –Graw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. ISBN: 84-481-3020-0.
- **CEPE. reglamentos de la Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas, 1995.** Pagina 5.
- **Confederación hidrográfica del tajo.** Plan especial de sequías de la cuenca hidrográfica del Tajo. Tomo I Documento de operatividad. Madrid: CHT, Julio, 2009.
- **CYTDE, 2001** Red iberoamericana de potabilización y depuración de las aguas. Agua potable para comunidades rurales y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas Capítulo 13. Disponible en Web< <http://www.tierra.rediris.es>>
- **España. Real Decreto 140/2003,** de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 7 de febrero 2003 nº 45 p.18.
- **Gamazo C., López-Goñi. I y Díaz R., 2005.** Manual práctico de microbiología. 3ª Edición. Editorial Masson. ISBN: 9788445815199.
- **Google Earth 1.0.1693 (beta)** (3 de agosto 2007), fecha de consulta: 8 de Marzo, 2010, URL:(<http://earth.google.com>)
- **Gray N. F, 2004.** Biology of Wastewater Treatment .2ª Edition. Editorial. Imperial College Press. Series on environmental Sciences and Management. Vol. 4. ISBN: I-86094-328-4.
- **Herráez Sánchez de las Matas I. y Morán A.** Evaluación de la calidad del río Jarama a su paso por el Parque Regional del Sureste. CONAMA8 (Madrid, 3 al 8 diciembre 2008 [S.I.]: [s.n.], 2008.
- **HL Barnett and Barry B, Hunter, 1972** Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4ª Edition. Editorial American Phytopathological Society ISBN-10: 0890541922.
- **Holden, W.S., 1970.** Water treatment and examination. J&A. Churchill Pub.Co.Londres.
- **Lapeña M.1982.** Estudio Microbiológico del río Henares. Director: Dr. Fernando Laborda Rodríguez. Universidad Alcalá de Henares. Departamento de microbiología.
- **Maier R., Gerba. C.P y Pepper I.L, 2000.** Environmental microbiology. 2ª Edición. Editorial Academic Press, cop. ISBN: 0124975704.
- **Manual básico de microbiología – cultimed, 2003** 4ª Edición. Edita Panreac química S, A
- **Marcano J. E, 2004.** Educación y ecología ambiental. Disponible en Web< <http://www.jmarcano.com> › Recursos naturales.
- **Martínez J. Geología del Henares, 2009.** Biotopo [Ref. 11 Marzo 2010]. Disponible en la web < <http://www.ecosistemahenar.es>>.
- **Pérez Granados R. y Peris Villaverde C, 1997** .Microbiología Tomo I. Bacteriología. Características y clasificación bacteriana .Características y técnicas bioquímicas. 1ª edición. Editorial internacional Thomson editores. Paraninfo.S.A. ISBN: 84-9732-123-5.
- **Pumarola A., 1995.** Microbiología y parasitología médica. 2ª Edición. Editorial Masson S. A. ISBN:84-458-0060-4



- **Redacción ambientum ,2002.** Autodepuración de los ríos. [Ref. marzo, 2002] Disponible en Web<<http://www.ambientum.com> ›.
- **Rivas C. ,1982** .Grave nivel de contaminación en los ríos Jarama y Henares. El PAIS [Ref.17 Enero ,1983].Disponible en la Web < <http://www.elpais.com>›.
- **Samson, RA,y Pitt ,Jl. 2000.**Manual of clinical microbiology, Volumen 2.8ª Edición. Masson S. A
- **SIGPAC.** Sistema de información geográfica de parcelas agrarias. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Disponible en<<http://www.mapa.es/es/sig/pags/sigpac/intro.htm> ›
- **Tipismana. Carlos E , Astudillo. Lilian R y Guillermo. Juan J.,2005.** Hongos de importancia agrícola presentes en moscas de la fruta del valle de Ica, Perú.
- **Unwater** .Día mundial del agua 2010 el agua limpia para un mundo sano. Burica Press – Medio Ambiente. [Ref. 17 Marzo ,2010] Disponible en Web <<http://www.unwater.org> ›
- **William McDonald, M.D. 2001** Morphology of Medically Important Fungi, 2nd Edition. Edit Univerity of California
- **2009.** Informe sobre el estado de conservación del río Henares (Tramo Guadalajara -Jarama). Informe inédito. Alcalá de Henares. [s.n.], 2009.51 p Informe de Plataforma salvemos al Henares.
- **2009.** Documentación adicional para el estudio de impacto ambiental del proyecto de ordenación paisajística de la isla del colegio (Alcalá de Henares) [REF. SEA: 65/08].Alcalá de Henares, 2009