


<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v71i1.52425>

## Efecto de la actividad truchícola sobre la concentración de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas de la cuenca alta del río Savegre, Costa Rica

Marco Retana L.<sup>1\*</sup>;  <https://orcid.org/0000-0003-1157-1282>

María Laura Arias-Echandi<sup>2</sup>;  <https://orcid.org/0000-0002-8611-4433>

Gilbert Barrantes<sup>1,3</sup>;  <https://orcid.org/0000-0001-8402-1930>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica; biretana@gmail.com (\*Correspondencia)
2. Facultad de Microbiología y Centro de Investigación de Enfermedades, Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, Costa Rica; maria.ariasechandi@ucr.ac.cr
3. Centro de Investigación en Biodiversidad y Ecología Tropical (CIBET), Universidad de Costa Rica, Costa Rica; gilbert.barrantes@gmail.com

Recibido 10-IX-2022. Corregido 04-I-2023. Aceptado 14-III-2023.

### ABSTRACT

#### Effect of trout farming activity on the concentration of total coliforms and *Escherichia coli* in waters of the upper Savegre river basin, Costa Rica

**Introduction:** The trout aquacultural activity has gradually increased in Costa Rican highlands. Residual waters from this activity are discarded directly in the rivers without any previous treatment process. Consequently, this activity could severely contaminate the river with bacteria that can affect human health.

**Objective:** To evaluate bacterial contamination from trout aquaculture on Río Savegre, Costa Rica.

**Methods:** We counted total coliforms and *Escherichia coli* from monthly samples (2015-2018) at three sections of the largest aquacultural development in the upper drainage of the river. We collected samples at the fish ponds entrance, exit and 200 m downwards.

**Results:** We found fewer total coliforms and *E. coli* in the water collected just at the exit of the fish ponds. We counted more total coliforms in 2016 and 2017, and more *E. coli* in 2016.

**Conclusions:** Coliform and *E. coli* counts are high in the river, but, unexpectedly, low in the water discarded from the fish tanks. Perhaps the mucus produced by the trouts or substances released by mosses on the fish tank walls reduce bacterial growth, as suggested by other studies. River pollution appears to come from other sources.

**Key words:** bacterial contamination; total coliforms; *Escherichia coli*; aquaculture; *Oncorhynchus mykiss*.

### RESUMEN

**Introducción:** La acuicultura de truchas ha incrementado gradualmente en las tierras altas de Costa Rica. Las aguas residuales de esta actividad son descartadas directamente en los ríos, sin tratamientos previos. Como consecuencia, la actividad truchícola puede contaminar severamente el agua de los ríos con bacterias que pueden afectar la salud humana.

**Objetivo:** Evaluar la contaminación bacteriana por la acuicultura de truchas en el río Savegre, Costa Rica.

**Métodos:** Contamos los coliformes totales y *Escherichia coli* de muestras mensuales (2015-2018) en tres secciones del proyecto de acuicultura más grande de la cuenca alta del río. Recolectamos las muestras en la entrada de los estanques para las truchas, a la salida, y 200 m hacia abajo.



**Resultados:** Encontramos menos coliformes totales y *E. coli* en el agua recolectada justo en la salida del agua de los estanques. El número de coliformes totales fue mayor en el 2016 y 2017, y de *E. coli* en el 2016.

**Conclusiones:** Censos de coliformes y de *E. coli* es muy alto en el río, pero inesperadamente, su número disminuye en el agua residual descartada de los estanques. Podría ser que el mucus producido por las truchas o sustancias liberadas del musgo que cubre la pared de los estanques reduzca el crecimiento de bacterias, como se ha sido sugerido en otros estudios. La contaminación del río parece venir de otras fuentes.

**Palabras clave:** contaminación bacteriana; coliformes total; *Escherichia coli*; acuicultura; *Oncorhynchus mykiss*.

## INTRODUCCIÓN

La actividad truchícola se ha incrementado lenta, pero progresivamente durante las últimas décadas en las zonas altas de Costa Rica (Otárola, 2018). Esta actividad, que en el país funciona a mediana y pequeña escala, requiere de un flujo constante de agua por lo que, sin un manejo apropiado, las aguas de los ríos pueden contaminarse seriamente, prácticamente desde el origen de la cuenca de los ríos (Bedwell & Goulder, 1996; Sidoruk, 2019).

En los ríos de las tierras altas de la Cordillera de Talamanca, particularmente el río Savegre, es donde ha proliferado con mayor intensidad la actividad truchícola. Este río fluye desde la parte más alta del Macizo del Cerro de la Muerte (3491 ms.n.m.) hasta el océano Pacífico, y su cuenca abarca una de las regiones más biodiversas del país (Sánchez et al., 2004). En las márgenes de este río se han asentado pequeños caseríos, albergues, hoteles, y varios proyectos dedicados a la producción de truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). En la mayoría de estas localidades no se cuenta con un sistema adecuado para el manejo y tratamiento de los desechos sólidos y líquidos, por lo que estos podrían llegar directamente al río, incluyendo aquellos producidos por la acuicultura de truchas.

Los desechos generados por la producción de truchas pueden contaminar severamente las aguas de los ríos (Bedwell & Goulder, 1996). Por esta razón es importante evaluar el nivel de contaminación producido para tomar medidas que puedan mitigar ese impacto. Uno de los

métodos más efectivos para evaluar el efecto contaminante de los desechos producidos por la actividad truchícola es el análisis de bacterias indicadoras (grupo coliforme) de contaminación fecal, siendo *Escherichia coli* el indicador más utilizado.

En Costa Rica, Morales et al. (2004) llevaron a cabo una evaluación bacteriológica en tilapias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas a menos de 400 ms.n.m. Sin embargo, el cultivo de las tilapias difiere marcadamente del de las truchas, ya que las tilapias no requieren un flujo constante de agua, y toleran un mayor grado de contaminación en sus aguas.

A nivel microbiológico, en Costa Rica no se ha realizado ningún estudio que evalúe la contaminación de los ríos generada por la producción de truchas. Por lo que proponemos como objetivo de esta investigación, evaluar el efecto que tiene el vertido de agua producto de la actividad truchícola sobre la cantidad de coliformes totales y *Escherichia coli* en las aguas, aparentemente cristalinas y limpias del río Savegre. Predecimos entonces que si la actividad truchícola es un factor contaminante de las aguas del río, la cantidad de bacterias coliformes y *E. coli* será significativamente más alta en el agua que sale del desarrollo truchícola que en el agua que entra. El diseño del experimento (ver sección de métodos) permitirá evaluar el efecto contaminante del vertido de aguas del proyecto truchícola más grande de la región, así como de la contaminación general del río provocada por otros proyectos truchícolas más pequeños y por el vertido de aguas negras de la comunidad aledaña.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de datos:** Este estudio se llevó a cabo en San Gerardo de Dota, provincia de San José (9°32' N 83°48' W, elevación 2 163 m), de agosto 2015 a diciembre 2018. Se escogió como sitio de estudio el proyecto de producción de truchas: “Truchas Reales de Costa Rica (TRCR)” por ser el proyecto de truchas de mayores dimensiones en la cuenca alta del río Savegre (2 000 m<sup>2</sup> de espejo de agua con estanques de concreto, con una producción promedio de tres mil kilos de trucha por semana). En TRCR se escogieron tres sitios de muestreo: el primero a 10 metros antes de la entrada de agua que abastece el proyecto, el segundo punto a la salida de aguas del proyecto y un tercer punto a una distancia de 200 m aguas abajo de la salida del proyecto. Este diseño de muestreo permitió evaluar si la producción y manejo de las truchas incrementa la cantidad de bacterias indicadoras y *E. coli* en el agua.

En cada punto de muestreo (entrada, salida, y a 200 m) se recolectó dos muestras de agua, cada mes durante 36 meses para un total de 108 muestras. Cada una de las muestras fue recolectada en una bolsa de plástico marca Twirl'EM® estéril de 100 ml para muestras de agua no clorada (Salfinger & Tortorello, 2015). Para obtener una muestra, se introdujo la bolsa, aproximadamente a 20 cm de profundidad contra corriente en el cauce del río. Después de extraer la bolsa, se cerró inmediatamente de manera hermética con los pliegues plásticos y se guardó en hielera a una temperatura entre 3 y 7 °C. Después de cada muestreo, las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Aguas de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, para su análisis. Este laboratorio se encuentra acreditado ante la norma 17025 2017 según el alcance N° LE-102 a partir del 23-04-2013. En este laboratorio se analizaron los coliformes total y *E. coli* mediante la técnica de número más probable (NMP) para aguas no cloradas. Brevemente, se realiza un enriquecimiento de la muestra en series de cinco tubos de caldo lauril sulfato, el cual se incubó a 35 °C por 48 h. La fase confirmatoria se

realiza en caldo bilis verde brillante incubado a 35 °C por 48 h y en caldo triptona incubado a 44.5 °C por 24 h para *Escherichia coli*, la cual es determinada mediante una prueba de indol (Baird et al., 2017).

**Análisis estadísticos:** Para analizar el efecto del agua vertida por el proyecto truchícola en el número de coliformes total y de *E. coli* se utilizó un Modelo Generalizado Mixto, con una distribución gaussiana de los errores (package lmerTest, Kuznetsova et al., 2017). En cada modelo se incluyó el sitio de recolecta (entrada, salida, y a 200 m de la salida) y el año de muestreo (2015-2018) como factores fijos, y el mes de muestreo como factor aleatorio. Se incluyó la fecha de muestreo como factor aleatorio para tomar en cuenta la variación resultante de muestrear recurrentemente en cada uno de los sitios. Los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los residuos de los modelos fueron evaluados para cada uno de los modelos realizados. Adicionalmente, se utilizaron contrastes para comparar los promedios de aquellos factores significativos (package emmeans, Lenth et al., 2022), basado en los resultados de los modelos. Todos los análisis los llevamos a cabo usando R (R Core Team, 2020).

## RESULTADOS

En total se analizó 108 muestras de agua para determinar presencia de coliformes y *E. coli*. Los coliformes son enterobacterias pertenecientes a un grupo muy heterogéneo y extenso de bacilos gram negativos de amplia distribución en aguas contaminadas (Brooks et al., 2011). El número de coliformes totales no varió significativamente entre sitios (Tabla 1, Fig. 1A), aunque sí entre años. El número de coliformes totales fue significativamente mayor en el 2016 y 2017 que el número registrado para el 2015, mientras que el número de coliformes fue similar entre los años 2015 y 2018 (Tabla 1, Fig. 1B).

En cuanto al número de *E. coli*, se encontró que no varió significativamente entre sitios. Aunque llama la atención que el número de



TABLA 1 / TABLE 1

Resultados del análisis del número total de coliformes y de la bacteria *Escherichia coli* en el agua recolectada antes de entrar al proyecto truchícola, a la salida y a 200 metros después de la salida, y entre cuatro años de muestreo. / Results of the analysis of the number of total coliforms and *Escherichia coli* collected in the water at the entrance, exit, and at 200 m from the exit of the fish ponds.

Total coliforms					
Factor	Coefficiente	E. E.	gl	Valor de t	P
Intercepto	571.86	142.50	28	4.01	< 0.001
Salida	-167.12	113.21	3	-1.48	0.236
200 m	-95.22	113.21	3	-0.84	0.462
2016	408.90	143.92	219	2.84	0.005
2017	516.64	145.54	219	3.55	< 0.001
2018	213.61	145.54	219	1.47	0.144
<i>Escherichia coli</i>					
Intercepto	577.91	126.58	222	4.57	< 0.001
Salida	-177.72	91.43	222	-1.94	0.053
200 m	-113.10	91.43	222	-1.24	0.217
2016	349.87	132.84	222	2.63	0.009
2017	-4.94	134.35	222	-0.04	0.971
2018	-136.15	134.35	222	-1.01	0.312

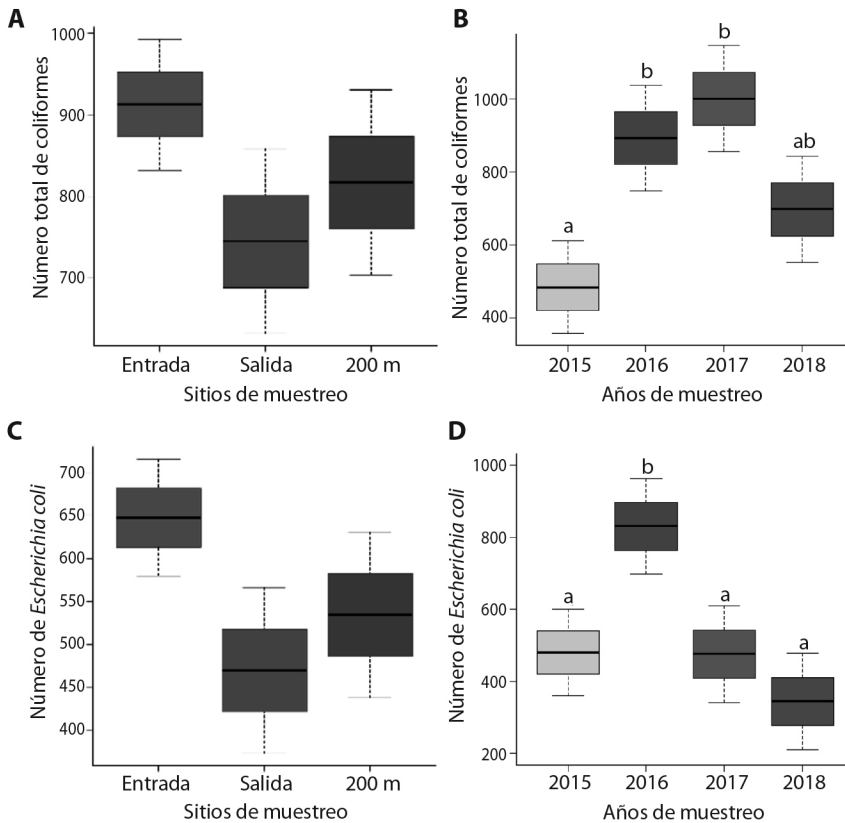
estas bacterias fue menor (marginamente significativa;  $P= 0.053$ ) en el agua recolectada a la salida del proyecto, comparado con las bacterias detectadas en el agua de entrada (Tabla 1, Fig. 1C). El número de *E. coli* fue significativamente mayor en el 2016 con respecto a los otros años de muestreo (Tabla 1, Fig. 1D).

## DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que no hay un impacto significativo en el total de coliformes ni en la cantidad de *E. coli* como resultado de las aguas vertidas del proyecto truchícola más grande de la zona (TRCR). Por el contrario, es importante señalar que el agua antes de entrar al proyecto ya viene con una gran carga de bacterias tanto coliformes en general como de *E. coli*, y la cantidad de *E. coli* es más bien menor cuando el agua sale del proyecto y es vertida nuevamente en el río Savegre. Esto sugiere que río arriba de donde se localiza el proyecto TRCR puede haber varias fuentes de contaminación que en conjunto son responsables de la gran cantidad de bacterias detectadas en el agua recolectada antes de ingresar a este proyecto.

Este río también supe de agua a otros proyectos truchícolas localizados aguas arriba del proyecto TRCR y de los cuales desconocemos el manejo de cada uno de ellos, particularmente el manejo relacionado a los residuos. Además, la topografía del lugar, con empinados taludes a cada lado del río, hace que las aguas residuales de casas y hoteles, así como los desechos fecales de animales domésticos desagüen directamente en el río, produciendo la gran carga de coliformes detectada. Sin embargo, información adicional es necesaria para determinar con mayor precisión cuales son los factores causantes de la gran cantidad de coliformes encontrada en el río.

La disminución de *E. coli*, pero no de todos los coliformes, encontrada en el agua de TRCR recién vertida en el río, no tiene una causa obvia. Se descarta en primer lugar el uso de antibióticos como el factor relacionado a la disminución de estas bacterias, ya que debido al flujo continuo de agua y a su baja temperatura del agua (10-12 °C) no se usan antibióticos, al menos en el proyecto TRCR. Otra posibilidad es que las mismas truchas produzcan alguna sustancia que afecte el crecimiento de



**Fig. 1.** Promedio de coliformes total y *Escherichia coli* por sitio y año de muestreo. **A.** Promedio de total de coliformes en los tres sitios muestreados: entrada del agua a los estanques, salida y a 200 m de la salida. **B.** Promedio de total de coliformes de cuatro años de muestreo. **C.** Promedio de total de *E. coli* en los tres sitios muestreados: entrada del agua a los estanques, salida y a 200m de la salida. **D.** Promedio de total *E. coli* de cuatro años de muestreo. La caja representa el error estándar en ambos extremos del promedio y las líneas representan los límites de confianza al 95 %. Cajas que comparten la misma letra indica que no hay diferencia significativa. / **Fig. 1.** Mean total coliforms and *Escherichia coli* by site and year sampled. **A.** Mean of total coliforms from the three sampling sites: entrance, exit, and at 200m from the exit. **B.** Mean of total coliforms from the four sampling years. **C.** Mean of total *E. coli* from the three sampling sites: entrance, exit, and at 200m from the exit. **D.** Mean of total *E. coli* from the four sampling years. The box corresponds to the standard error around the mean and the lines indicate 95 % confidence intervals. Boxes with the same letters indicate no-significant differences.

la población de *E. coli*. Por ejemplo, es conocido que la capa mucosa de la piel de muchos peces, incluyendo truchas, tiene una función bactericida y actúa como una barrera contra muchos patógenos (Dash et al., 2018; Subramanian et al., 2007; Subramanian et al., 2008). En 6 truchas recolectadas en TRCR no se aislaron coliformes en la capa mucosa de la piel, branquias, ni en tracto digestivo. Esto apoya, al menos de manera indirecta, que las secreciones mucosas podrían estar limitando el establecimiento de coliformes en estos peces, y podría

ser un elemento regulador de las poblaciones, al menos de *E. coli*. De la misma manera, el musgo que crece sobre las paredes de los estanques podría tener un efecto bactericida como se ha reportado en varios estudios (Khazigaleeva et al., 2017; Savaroğlu et al., 2011). Por último, el sedimento que se acumula en el fondo de los estanques podría funcionar como una “trampa de bacterias” y disminuir su abundancia en el agua. Esto podría producirse porque *E. coli* es una bacteria predominantemente anaeróbica (Jang et al., 2017), y por las condiciones que



se dan en los estanques, estas bacterias podrían asociarse más al sedimento del fondo, donde la cantidad de oxígeno es menor. Estas ideas son especulativas y necesitan ser probadas.

Otro de nuestros resultados muestra que la cantidad de coliformes (total) fue mayor en los años 2016-2017. De manera similar, la cantidad de *E. coli* fue mayor en el 2016. Un evento del Niño se dio entre el 2015-2016 y estos eventos se correlacionan con periodos secos más extensos en la zona (Waylen et al., 1994). Sin embargo, no se detectó una disminución marcada en el caudal del río durante ese periodo. Además, en el 2018, año que corresponde a la fase neutra del ENSO (El Niño-Oscilación del Sur), la cantidad de bacterias fue menor que los dos años previos. Es posible entonces que la fluctuación temporal en la cantidad de coliformes (total y *E. coli*) esté más relacionada con actividades locales, como puede ser el aumento en la ocupación de los hoteles por la actividad turística, con el consecuente aumento de aguas residuales desechadas hacia el río. Otra hipótesis que necesita ser verificada.

Resumiendo, las aguas cristalinas del río Savegre acarrean una gran cantidad de bacterias coliformes (total y *E. coli*). La contaminación por bacterias se da desde aguas arriba de donde se localiza el proyecto TRCR, y contrario a lo que esperábamos, la cantidad de *E. coli* es menor en el agua que sale directamente de proyecto. Esto hace suponer que la mucosidad u otras sustancias que producen las truchas, o el musgo que crece sobre las paredes de los estanques podría regular la población de *E. coli* (Dash et al., 2018; Khazigaleeva et al., 2017; Savaroğlu et al., 2011; Subramanian et al. 2007; Subramanian et al., 2008). Este hallazgo no excluye la posibilidad de que se produzca una mayor contaminación, por ejemplo, de residuos sólidos o algunos compuestos químicos (e.g., nitrato de amonio; Sidoruk, 2019).

**Declaración de ética:** Los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los

requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

## AGRADECIMIENTOS

Al señor Miguel Víquez, propietario de TRCR por permitir el ingreso a su proyecto, al personal del Laboratorio de Aguas de la Facultad de Microbiología por el análisis de las muestras de agua, a la Vicerrectoría de Investigación por su apoyo mediante el proyecto 111-B5-287, a Gabriela Álvarez por su colaboración en las giras de campo.

## REFERENCIAS

- Baird, R., Eaton, A., & Rice, E. W. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23<sup>rd</sup> Ed.). American Water Works Association & Water Environment Federation.
- Bedwell, M. S., & Goulder, R. (1996). Bacterial outputs from ponds and tanks used in intensive fish farming bacterial outputs from ponds and tanks used in intensive fish farming. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 412–416.
- Brooks, F., Carrol, K., Butel, J. Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Microbiología Médica*. McGraw-Hill Interamericana.
- Dash, S., Das, S. K., Samal, J., & Thatoi, H. N. (2018). Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19, 72–81.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 570–581.
- Khazigaleeva, R. A., Vinogradova, S. V., Petrova, V. L., Fesenko, I. A., Arapidi, G. P., Kamionskaya, A. M., Govorun, V. M., & Ivanov, V. T. (2017). Antimicrobial activity of endogenous peptides of the moss *Physcomitrella patens*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 43, 248–254.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest Package: tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software*, 82, 1–26.

- Lenth, R. V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., & Singmann, H. (2022). *Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means*. <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>
- Morales, G., Blanco, L., Arias, M. L., & Chaves, C. (2004). Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *54*, 433–437.
- Otárola, A. (2018). Departamento de Acuicultura, INCOPECA.
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Salfinger, Y., & Tortorello M. L. (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5<sup>th</sup> Ed.). American Public Health Association.
- Sánchez, J. E., Barrantes, G., & Durán, F. (2004). Distribución, ecología y conservación de las aves de la cuenca del río Savegre, Costa Rica. *Brenesia*, *61*, 63–93.
- Savaroglu, F., Filik-Iyçen, C. Oztopcu-Vatan, A. P., Kabardere, S., Ilhan, S., & Uyar, R. (2011). Determination of antimicrobial and antiproliferative activities of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Turkish Journal of Biology*, *35*, 361–369.
- Sidoruk, M. (2019). Effect of rainbow trout production in a two-stage cascade system on water quality. *Journal of Elementology*, *24*, 739–753.
- Subramanian, S., MacKinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *148*, 256–263.
- Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2008). Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *150*, 85–92.
- Waylen, P. R., Quesada, M. E., & Caviedes, C. N. (1994). The effects of El Niño-southern oscillation on precipitation in San José, Costa Rica. *International Journal of Climatology*, *14*, 559–568.