

Contribución al estudio de la micropoblación de aguas minerales envasadas

Isabel MORO* y M.^a del Carmen de la ROSA JORGE**

RESUMEN

Se ha estudiado durante un año, la micropoblación de un agua envasada y de la procedente del punto de emergencia de las mismas. El número de bacterias aerobias es bajo, < 400/ml., siendo mayor en el agua envasada.

No se han encontrado bacterias patógenas ni indicadores de contaminación fecal. El número de *Pseudomonas* ha sido alto en el punto de emergencia, identificándose como *P. pseudoalcaligenes*, y bajo en el agua envasada, en la que se aislaron *P. aureofaciens* y *P. mendocina*. No se han encontrado celulolíticos, sulfato-reductores, actinomicetos ni bacterias del hierro. Los amilolíticos se han detectado en todas las muestras en número alto. Los proteolíticos aparecen en verano en el manantial y en invierno en el agua envasada. Los hongos se encuentran en número bajo, < 400 por 100 ml., predominando en verano. Los microorganismos heterótrofos más frecuentes han sido: *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Alcaligenes*.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié, au cours d'une année, la micropopulation de l'eau de la source minero-medicinale ainsi que des échantillons de la même eau embouteillée. Le nombre de bactéries aérobiennes est bas < 400/ml tout en présentant une concentration supérieure pour l'eau embouteillée.

Nous n'avons pas trouvé de bactéries pathogènes ni d'indicateurs de contamination fécale.

Le nombre de *Pseudomonas* est relativement important à pied de source, appartenant à l'espèce *P. pseudoalcaligenes*. Dans l'eau embouteillée ce nombre est beaucoup moindre ayant

été identifiées les espèces de *P. aureofaciens* et *P. mendocina*.

Nous n'avons pas trouvé de cellulolytiques, sulfato-réducteurs, actinomycètes ni de bactéries du fer.

Les amilolytiques ont été détectés dans tous les échantillons en nombre important. Les proteolytiques sont présents en été à pied de source et en hiver dans l'eau embouteillée. Les champignons se trouvent en faible concentration < 400/100 ml, en particulier en été.

Les microorganismes hétérotrophes les plus fréquents ont été les *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Alcaligenes*.

SUMMARY

We have studied for one year the microbial population in spring water at the fountainhead and also in water bottled from it. The number of aerobic bacteria was low, less than < 400 cells/ml, with the highest values being obtained in bottled water. No pathogenic bacteria nor bacteria indicating a fecal contamination were found. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* was found in high levels in the spring whereas low levels of *P. aureofaciens* and *P. mendocina* were detected in bottled water. Neither cellulolytic, sulphate-reducing, actinomycetes nor ferric bacteria were detected in any of the samples.

Amylolytic microorganisms were detected in high number in all samples. Proteolytic bacteria increased in the spring during summer, whereas in bottled water they peaked during winter. Fungi were found in low number, less than < 400 cells/100 ml, mainly during summer. The heterotrophic microorganisms most frequently isolated were *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Alcaligenes*.

* Jefe de Sección de Biología y Microbiología y Micro-biología. Dirección General de Salud. Barcelona.

** Prof. Titular de Microbiología. Fac. de Farmacia. Univ.Complutense de Madrid.

Introducción

Es necesario conservar las aguas envasadas minerales en las condiciones más análogas a su emergencia pero, además, si se emplean como aguas de mesa, deben cumplir las exigencias de los consumidores en cuanto a sabor, carencia de olor, color y materias en suspensión, unido a una buena presentación y envasado.

En los manantiales de aguas minerales en general, existe siempre una micropoblación que suele ser numéricamente pequeña, pero muy constante. Cuando el agua se envasa las bacterias autóctonas pueden multiplicarse en la botella y alcanzar un número mayor que en el punto de emergencia. Este hecho plantea una de las cuestiones más polémicas en la problemática de estas aguas, pues aún se conoce muy poco sobre la influencia de esta micropoblación en la calidad de las aguas y de su efecto nocivo o beneficioso (22). La legislación actual (4) dispone que debería realizarse un estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales durante varios ciclos estacionales con el fin de aislar e identificar la micropoblación autóctona que proporciona junto a otros componentes de naturaleza físico-química las cualidades organolépticas específicas de cada una de ellas.

En este trabajo se ha estudiado a lo largo de un año, la distribución de la micropoblación del agua envasada y la del punto de emergencia de un determinado manantial de agua mineral, con el fin de determinar la influencia de las variaciones estacionales. La investigación se ha realizado desde un punto de vista sanitario estudiando los microorganismos alóctonos que la reglamentación técnico-sanitaria exige, y desde un aspecto ecológico estudiando los principales grupos de microorganismos autóctonos que se pueden encontrar en las aguas naturales.

Materiales y métodos

Muestras.—Se ha estudiado el agua envasada y la tomada del punto de emergencia del manantial en condiciones estériles, en los meses de enero, febrero, abril, junio, julio y septiembre del mismo año.

Por las características físico-químicas, estas aguas eran: oligometálica, silicatada, sulfatada cálcica, bicarbonatada, radioactiva y mesotermal; siendo la temperatura media de surgencia de 34° C y el pH 6,7. Las aguas procedentes de este manantial, se filtran a través de filtro de membrana de 0,45 micrometros de poro, se embottellan automáticamente, se tapan y se etiquetan.

Estudio microbiológico.—Se realizaron los siguientes recuentos: bacterias aerobias viables a 22° C, 37° C y 45° C, coliformes totales y estreptococos fecales, siguiendo los métodos de la legislación española (3). El recuento de las esporas de clostridios sulfito-reductores se hizo a 37° C y 45° C en agar sulfito de hierro (14). El recuento de *Pseudomonas* se realizó por el método del número más probable (NMP) en caldo asparragina y posterior aislamiento en agar cetrimida (9). El número de bacterias proteolíticas, amilolíticas y celulolíticas se determinó por el método del NMP en los medios citados por Pochon y Tardieux (20). El de bacterias sulfato-reductoras por el mismo método en el medio de Starkey (14). El número de actinomicetos se determinó por siembra en superficie en medio agar glicerol-asparragina-cicloheximida (11) y el de mohos y levaduras por filtración empleando filtros de 0,45 micrometros que se incubaron a 22° C sobre agar Sabouraud oxitetraciclina (9). Así mismo se investigó la presencia en 100 ml. de bacterias del hierro en el medio Duchon-Miller (14) y de *Staphylococcus aureus* en caldo triptona soja a doble concentración aislando en agar Baird-Parker (2).

La identificación de las bacterias aerobias heterótrofas se hizo siguiendo el esquema de Chevalier *et al.* (10) utilizando las siguientes pruebas: morfología, tinción de Gram, movilidad, oxidasa, catalasa, utilización de la glucosa, tipo respiratorio, producción de pigmentos y formación de esporas. A las cepas de *Pseudomonas* se les hicieron además las pruebas de: producción de piocianina y fluoresceína, crecimiento a 42° C, reducción de nitratos, hidrólisis de gelatina, producción de arginina dehidrolasa (12) y utilización de trehalosa (14). Todas las pruebas con excepción de las que se especifican se realizaron siguiendo los métodos de Buttiaux *et al.* (7) y las cepas se clasificaron según el Manual de Bergey (5).

Resultados

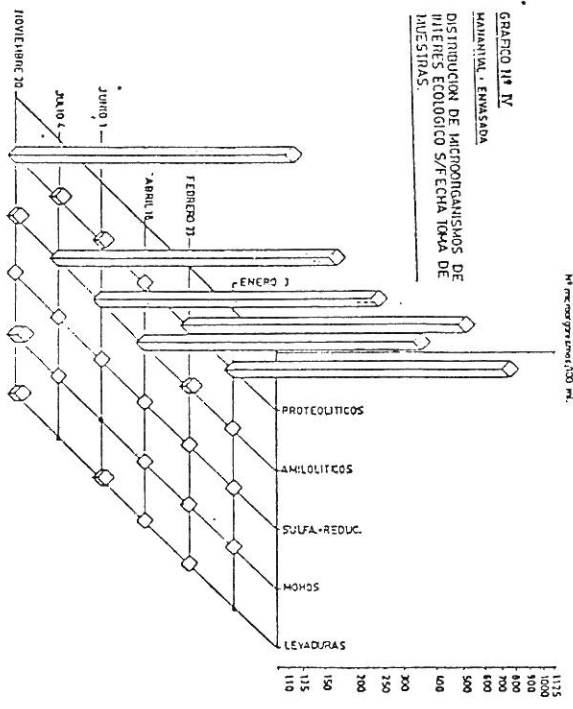
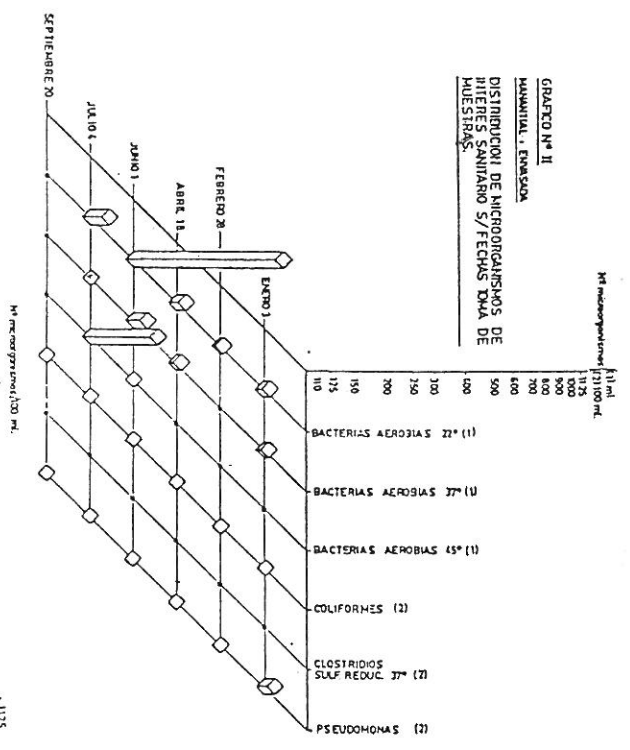
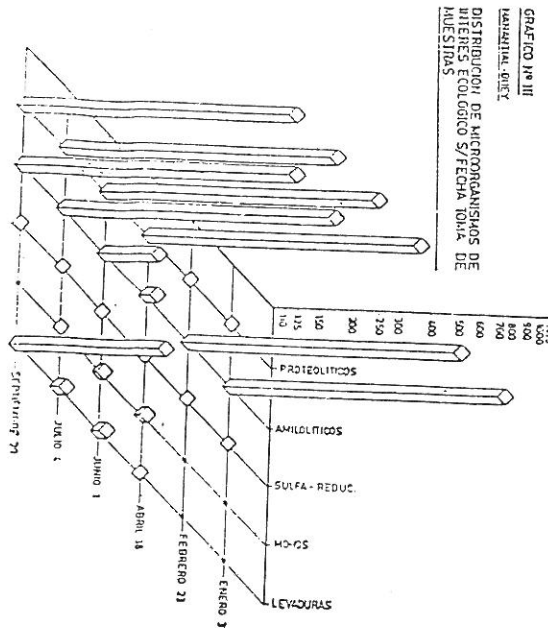
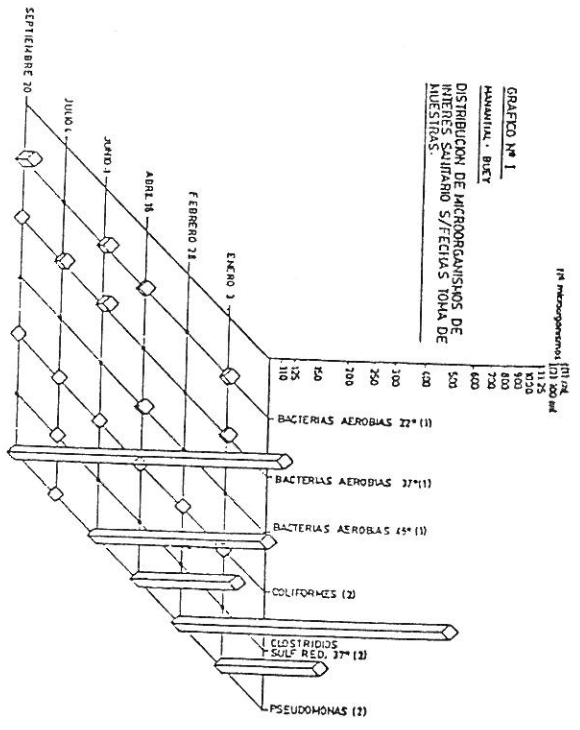
Bacterias aerobias.—El número de estas bacterias en el punto de emergencia es muy pequeño predominando las de 22° C y sólo han aparecido bacterias termófilas en una muestra. El agua envasada presenta un número mayor de estos microorganismos en todas las muestras, predominando también las de 22° C. Las bacterias termófilas se aislaron en dos muestras (tabla 1, gráficos I y II).

BACTERIAS AEROBIAS EN EL MANANTIAL Y AGUA ENVASADA EN LAS DIVERSAS TOMAS DE MUESTRA

Bacterias aerobias	Muestra	E*	FECHA TOMA DE MUESTRAS				
			F	A	J	Jl	S
22° C	Manantial	33	2	17	47	—	100
	Envasada	46	11	62	360	119	—
37° C	Manantial	14	—	—	52	18	2
	Envasada	25	—	19	104	3	2
45° C	Manantial	—	—	12	—	—	—
	Envasada	—	—	—	4	180	—

* E: enero, F: febrero, A: abril, J: junio, Jl: julio, S: septiembre.

Tabla 1



Microorganismos de interés sanitario (Gráficos I y II). No se han encontrado indicadores fecales ni *S. aureus* en ninguna muestra tanto en el punto de emergencia como en el agua envasada. El número de *Pseudomonas* ha sido alto en el punto de emergencia en comparación con el agua envasada donde ha sido baja en los dos meses en que se han detectado. No se ha encontrado *P. aeruginosa*. Las cepas aisladas se han identificado como *P. pseudoalcaligenes* en el punto de emergencia y *P. aureofaciens* y *P. mendocina* en el agua envasada.

Microorganismos de interés ecológico (Gráficos III y IV). No se han encontrado celulolíticos, sulfato-reductores, actinomicetos ni bacterias del hierro en ninguna época del año, en ambas muestras. Los microorganismos amilolíticos se han detectado en todas las muestras, en número en general alto, mientras que los proteolíticos aparecen en la época calurosa en el punto de emergencia y en la época fría, en número más alto, en el agua envasada.

Los hongos se encuentran en número pequeño, siendo en general mayor las levaduras. El agua envasada presenta menor número que el manantial aunque en este último no se detectaron hongos en invierno.

Identificación de bacterias heterótrofas.—Los microorganismos heterótrofos más frecuentemente aislados han sido bacilos Gram negativos, no fermentadores, pertenecientes a los géneros: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*. En algunas muestras se aislaron también cocos Gram positivos del género *Micrococcus* (tabla 2).

DISTRIBUCION DE LOS GENEROS DE BACTERIAS HETEROTROFAS EN EL MANANTIAL Y EN EL AGUA ENVASADA

Géneros	Manantial	Envasada
<i>Pseudomonas</i>	5*	2
<i>Xanthomonas</i>	3	2
<i>Eceinetobacter</i>	1	—
<i>Flavobacterium</i>	1	—
<i>Alcaligenes</i>	1	2
<i>Micrococcus</i>	1	2

*: Número de muestras.

Tabla 2

Discusión

Hemos estudiado el número de bacterias aerobias viables (aunque la normativa española no lo exige para las aguas mineromedicinales), porque expresa el índice de contaminación general de las aguas y es útil para controlar la protección de un agua profunda de las posibles contaminaciones exógenas.

En el punto de emergencia el número de bacterias aerobias ha sido bajo a lo largo del año lo que indica una buena protección, siendo mayor los recuentos obtenidos a 22° C que a 37° C, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (6, 8, 15) ya que las bacterias autóctonas crecen a temperaturas bajas. También hay que tener en cuenta que muchos microorganismos quedan excluidos de este recuento por sus especiales exigencias nutricionales o de cultivo.

En las muestras de agua envasada ha variado significativamente el número de bacterias, pudiendo tener relación estas oscilaciones, además de otros factores, con la limpieza del filtro empleado antes del embotellado. Schmidt-Lorenz (26) también ha observado un incremento en el número de bacterias después del tratamiento por filtración. Pero como está permitido el sistema de filtración por membrana y no se considera por la legislación vigente como índice de contaminación el número de bacterias aerobias, desde el punto de vista sanitario es un agua que reúne las condiciones aptas para el consumo.

En cuanto a los microorganismos de interés sanitario no se han aislado bacterias patógenas ni indicadores de contaminación fecal ni en el manantial ni en el agua envasada, por lo que todas las muestras pueden considerarse como potables desde el punto de vista microbiológico.

El género *Pseudomonas* ha sido el microorganismo más frecuente, observándose una cierta relación estacional ya que predominan en otoño-invierno. Resultados semejantes obtuvimos en el estudio de manantiales fríos de Caldas de Carabaña. No se han encontrado especies patógenas, observándose con más frecuencia especies no pigmentadas, lo que coincide con otros autores (13, 15, 21). Así, *P. pseudoalcaligenes*, aislado en el punto de emergencia, también ha sido encontrado en otros manantiales (18, 19, 23) y *P. mendocina*, que fue aislado en el agua envasada, fue encontrado por Mosso *et al.* en el agua envasada de Carabaña (18).

Los otros géneros de bacilos Gram negativos no fermentadores han sido aislados también en aguas mineromedicinales: *Xanthomonas* (6, 18, 19, 25), *Acinetobacter* (15, 18, 19, 22, 23, 25, 27), *Flavobacterium* (13, 18, 22) y *Alcaligenes* (18, 22, 23). En menor proporción se aislaron *Micrococcus* que ha sido encontrado por otros autores como constituyente de la flora autóctona de las aguas de manantial (1, 19, 22, 23, 24, 25, 26).

Con respecto a los microorganismos de interés ecológico sólo se han encontrado proteolíticos y amilolíticos en número alto, lo que indica

que estas aguas poseen capacidad autodepuradora ya que estos microorganismos pueden degradar la materia orgánica. Suelen ser frecuentes estos tipos de microorganismos en las aguas naturales y se han encontrado cifras semejantes en otros manantiales mineromedicinales (17, 23, 24, 25). Incluimos en este grupo los mohos y levaduras ya que tanto las legislaciones extranjeras como la española no los consideran de interés desde el punto de vista de la potabilidad. Las aguas de manantiales mineromedicinales suelen tener un número muy bajo de hongos porque al ser organismos heterotrofos necesitan materia orgánica y dichas aguas carecen prácticamente de ella (19, 23, 24). Se observa un aumento en el verano ya que por ser mesófilos, en esta época se desarrollan en todos los ambientes. Resultados semejantes encontraron Mosso *et al.* (17) en el agua de Carabaña.

BIBLIOGRAFIA

1. AGOS, B.; SESMA, B.; PEREZ DE CIRIZA, J. A.; ARCOS, J. M. (1979). «Flora aerobia autónoma en aguas mineromedicinales». VII Congreso Nacional de Microbiología. Cádiz, 612-616.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). (1984). «Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods». Ed. Marvin L. Speck. Washington.
3. BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO, n.º 76, 29 de marzo de 1975, págs. 6468-6475. «Decreto por el que se regulan las especificaciones microbiológicas a las que han de ajustarse las aguas mineromedicinales envasadas».
4. BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO, n.º 226, 21 de septiembre de 1981, págs. 21898-21903. «Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de las aguas de bebida envasadas».
5. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. (1974) «Bergey's manual of determinative bacteriology». 8th Ed. Williams and Wilkins Baltimore.
6. BUTTIAUX, R., et BOUDIER, A. (1960) «Comportement des bactéries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipients hermétiquement clos». Ann. Inst. Pasteur Lille, 11, 43-53.
7. BUTTIAUX, R.,; BEERENTS, H., et TACQUET, A. (1974). «Manuel de Techniques bactériologiques». Ed. Médicales Flammarion, Paris.
8. CABO, J.; BECERRIL, M. C., y CABAÑAS, A. (1974) «Biología bacteriológica de las aguas embotelladas de un manantial». Comunicación primeras jornadas de calidad de las aguas mineromedicinales. E. Centro de Estudios Medio Ambiente. Madrid.
9. CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACION Y NUTRICION (CNAM) (1976) «Métodos de examen microbiológico para alimentos y bebidas. Normas recomendadas». Ed. CNAM. Madrid.
10. CHEVALLIER, M. W., L.; SEIDLER, R. J., and EVANS, T. M. (1980) «Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies». App. Environ. Microbiol. 40, 922-930.
11. CORKE, C. T., and CHASE, F. E. (1956) «The selective enumeration of actinomycetes in the presence of large numbers of fungi». Can. J. Microbiol. 2, 12-16.
12. COWAN, S. T., and STEEL, K. J. (1974) «Manual for the identification of medical bacteria». 2nd. Ed. Cambridge University Press. Cambridge.
13. DELABROISE, A. M., et DUCLUZEAU, R. (1974) «Le microbisme naturel de l'eau minérale, son développement, son innocuité sur l'organisme». Ann. Hyg. L. Fr. Méd. et Nut., 2, 189-192.
14. GUINEA, J.; SANCHO, J., y PARES, R. (1979) «Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados». Ed. Omega. Barcelona.
15. GUTIERREZ, C., y GONZALEZ, C. C. (1983) «Aspectos microbiológicos del agua mineral natural». Comunicación IX Congreso Nacional de Microbiología, Vol. I, tomo 2, 1023-1024. Ed. Comité Organizador IX CNM. Valladolid.
16. MOSSO, M. A.; DE LA ROSA, M. C.; DIAZ, F., y GASTON DE IRIARTE, E. (1981) «Microbiología del agua de Carabaña». An. Real Acad. Farm. 47, 327-334.
17. MOSSO, M. A.; DE LA ROSA, M. C., y DIAZ, F. (1985) «Distribución anual de la micropoblación en manantiales de aguas mineromedicinales de Carabaña». An. Bromatol. XXXVII-2, 261-269.
18. MOSSO, M. A.; DIAZ, F., y DE LA ROSA, M. C. (1985) «Contribución al estudio de las bacterias autóctonas de manantiales de aguas mineromedicinales de Carabaña». An. Bromatol. XXXVII-2, 271-278.
19. MOSSO, M. A.; DIAZ, F., y DE LA ROSA, M. C. (1986) «Microbiología de las aguas mineromedicinales de Archena». An. Real Acad. Farm. Memoria n.º 12, 23-32.
20. POCHON, J., et TARDIEUX, P. (1956) «Techniques d'analyse en microbiologie du sol». Ed. Tourelle de la St. Maude (seine).
21. QUEVEDO, J.; RIVADENEYRA, M. A., y PEREZ-GARCIA, I. (1983) «Pseudomonas formadores de calcita y estruvita aislados de manantiales». Comunicación IX Congreso Nacional de Microbiología. Vol. I, tomo 2, 935-936. Ed. Comité Organizador IX CNM. Valladolid.
22. RAMOS CORMENZANA, A., y QUEVEDO, J. (1983) «Bacteriología de las aguas mineromedicinales». En Microbiología 83. Vol. 2, págs. 731-734. Ed. Sociedad Española de Microbiología. Madrid.
23. DE LA ROSA, M. C.; DIAZ, F.; MOSSO, M. A., y GASTON DE IRIARTE, E. (1983). «Microbiología de las aguas mineromedicinales de Alhama de Aragón». An. Real Acad. Farm. 49, 381-388.
24. DE LA ROSA, M. C.; DIAZ, F.; MOSSO, M. A. (1985) «Microbiología de las aguas mineromedicinales de Fuente Amarga». An. Real Acad. Farm. Memoria n.º 11, 17-24.
25. DE LA ROSA, M. C., y MORO, I. (1986) «Estudio microbiológico de los manantiales de aguas mineromedicinales de Caldas de Bohí». An. Real Acad. Farm., 52, 553-562.
26. SCHMIDT-LORENZ, W. (1976) «Microbiological characteristics of natural mineral water». Ann. Inst. Super. Sanita. 12, 93-112.
27. TERRONES, R., y MELLADO, A. (1980) «Calidad bacteriológica de aguas mineromedicinales». Rev. San. Hig. Pub. 54, 79-88.