

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE MICROORGANISMOS EN UN BALNEARIO DE LA PROVINCIA DE OURENSE

1) **Conde Vendrell, M.** Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Dirección: Simón de Monasterio, 1, 2º A, 32002. Ourense. Telf.: 988238637.

2) **Fernández Gil, P.** Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

3) **Sáa Muñoz, A. I.** Licenciada en Biología.

4) **Rodríguez Míguez, L.** Doctor en Medicina. Profesor titular de la Universidad de Vigo.

5) **Rodríguez López, L. A.** Doctor en Microbiología. Profesor titular interino de la Universidad de Vigo.

Area de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, Campus de Ourense. Fax: 988 38 70 01. Tel.: 988 38 70 66. - lalopez@uvigo.es

RESUMEN

Se ha realizado el estudio microbiológico sobre una muestra de agua recogida en un balneario de uso privado situado en la provincia de Ourense, y otras dos muestras recogidas en dos puntos situados en las inmediaciones del balneario (200 y 100 metros, aproximadamente), con el objeto de comprobar su posible contaminación bacteriológica, pues al ser agua mineromedicinal de consumo público debe ser potable.

En este trabajo se ha determinado en los puntos muestreados la presencia de indicadores de contaminación del tipo coliforme fecal, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* sulfito-reductor, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Salmonella*, cuya presencia en aguas de consumo está prohibida por la Legislación Española que actualmente se aplica para reglamentar para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público (BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990).

Palabras clave: Balneario, contaminación, agua mineromedicinal.

SUMMARY

A microbiological analysis has been done in one water sample got in a balneary for private consumption situated in the country of Ourense, and 2 places situated in the surroundings (200 and 100 meters, approx.) of the balneary, to evaluate bacterial contamination, because the mineromedicinal water for public consumption must be potable.

In the tested samples have been analyzed the presence of contamination indicators such as faecal coliforms, sulfite reductor *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Vibrio* and *Salmonella*, prohibited by the Spanish Legislation applied actually (BOE número 226, 20 of September of 1990).

Key words: Balneary, contamination, mineromedicinal water.

RESUMEN

On a réalisé un étude microbiologique sur une échantillons d'eau pris dans un balnéaire privé situé dans la province d'Ourense, et autres deux échantillons ramassées de deux points situés près du balnéaire (200 et 100 mètres, approximatif), avec l'objet de vérifier sa possible contamination, parce que il s'agit d'eau minéralomédicinal de consommation public et il doit être potable.

Dans ce travail on a déterminé dans les points mesures la présence des indicateurs de contamination du genre coliforme fécal, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Vibrio* and *Salmonella*, dont la présence dans l'eau de consommation est interdit pour la Législation Espagnole, que actuellement on destine pour régler le approvisionnement et control de la qualité d'eaux potables de consommation publique (BOE numero 226, 20 of Septembre of 1990).

Most clef: Balnéarie, contamination, eau minéralo-medicinal

INTRODUCCIÓN

Las aguas termales se incluyen en las aguas mineromedicinales, y son aguas que tienen un interés o finalidad terapéutica. Estos tipos de agua han dado lugar a una industria muy importante sujeta a una serie de normas legales en relación con su captación, elaboración, circulación y comercio que son de obligado cumplimiento por las empresas implicadas en dichos procesos.

Las aguas naturales, bien sean superficiales o profundas sólo excepcionalmente son estériles, si bien puede admitirse que las aguas mineromedicinales por su propia mineralización y muchas veces por su elevada temperatura, no constituyen un medio adecuado para el desarrollo de los microorganismos. Este tipo de aguas pueden contener microorganismos (flora y fauna) que, a veces, están directamente relacionados o son dependientes de las características físicas y químicas de las aguas que los vehiculizan. (Armijo; Bacaioca. 5)

Desde un punto de vista microbiológico, la problemática de todas las aguas es muy similar, pues cualquier agua que se beba debe ser microbiológicamente potable y más si la van a usar en principio personas que posean sus defensas disminuidas. Esto lleva consigo la necesidad de un control sanitario de todas las aguas.

La Legislación que actualmente se aplica para reglamentar la elaboración, circulación y comercio de las aguas mineromedicinales (B.O.E. núm. 178, de 26 de Julio de 1991), define éstas como aquellas aguas que emergen espontáneamente en la superficie de la tierra o se captan mediante labores practicadas al efecto del interior del suelo y de las que se tiene declaración de interés público y posean autorización de aprovechamiento. Estas aguas han de ser aptas para tratamientos terapéuticos en el área de emergencia o balneario, disponiendo de estudios clínicos sobre evolución de procesos específicos y conservar una vez envasadas, efectos útiles sobre los mismos. Parecidos requisitos legales, deben de reunir las aguas minerales naturales, que sin llegar a tener propiedades terapéuticas, poseen una acción favorable complementaria de las funciones fisiológicas (Armijo; Bacaioca. 5).

Aparte de las sustancias de origen natural que pueden adquirir estas aguas, hay otras sustancias que tienen su origen en residuos humanos procedentes directamente del hombre o indirectamente de sus actividades. Cuando ocurre esto, se dice que

el agua está *contaminada o polucionada*, que será la alteración microbiológica por productos químicos orgánicos o inorgánicos, respectivamente. La contaminación consiste en una modificación, generalmente provocada por el hombre, de la calidad del agua, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca, las actividades deportivas así como para los animales domésticos y la vida natural.

Cualquier agua contaminada por heces, aguas residuales, etc., y no depurada, es peligrosa. Asimismo cuanto menos es el tiempo transcurrido entre el momento de la contaminación y el empleo del agua, es decir, cuanto más rápida es la transmisión, mayor es el peligro de infección (Olivieri. 21).

La fuente de agua termal es de utilidad pública y como tal debe cumplir las condiciones de potabilidad de agua. En la Legislación Española (BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990, relativa a la reglamentación técnico sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público) se diferencia entre análisis normales, mínimos, completos, ocasionales e iniciales, estableciéndose las condiciones y frecuencia en que podrán ser realizados. Los análisis completos, realizados en este trabajo, incluyen la determinación de coliformes totales, coliformes fecales, *Enterococcus*, *Clostridium* sulfito-reductores, patógenos humanos (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*) y bacterias aerobias a 37° y 22°C.

Debido a la naturaleza de estas bacterias, es evidente que una de las mayores fuentes de contaminación de las aguas mineromedicinales, son las aguas residuales que llevan como flora normal estos microorganismos fecales. Otra fuente importante de contaminación son las aguas de desecho de industrias como mataderos, que vierten sus residuos por colectores cuyas aguas contaminadas terminan desembocando, o bien en las proximidades de la fuente, o bien en ella misma. (Rheinheimer. 22).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar si existe contaminación en la fuente estudiada, y de haberla, si puede provenir de las aguas de sus alrededores, pues al existir infiltraciones en el suelo, el agua contaminada puede mezclarse con el agua de la fuente.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo se llevó a cabo en tres puntos de la zona, uno de ellos en la propia surgencia, y los otros dos situados en sus inmediaciones, aproximadamente a 100 metros de ella. Las muestras se recogieron en botellas estériles de 1 litro y se llevó a cabo su análisis bacteriológico inmediatamente después de su llegada al laboratorio. (APHA, AWWA & WPCF 4) (Borrego. 7) (División Merck. 13) (Olivieri. 21) (Rheinheimer. 22).

Se determinó la presencia/ausencia de coliformes fecales y totales, *Enterococcus*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium* sulfito-reductores y *Salmonella* siguiendo los métodos oficiales de análisis microbiológicos de aguas potables de consumo directo especificados en el BOE número 193 del 13 de Agosto de 1983.

El método usado en todas las bacterias analizadas (excepto coliformes y *Clostridium*), fue el método de filtración por membrana: Se midieron 100mL del agua de muestra en probetas estériles y se filtraron en un aparato de filtración estéril. Tras la filtración de la muestra se recogieron las membranas (filtros casa Albet.Barcelona. España. de 0'22 y 0'45 u) y se depositaron en placas con el medio de cultivo sólido adecuado para el crecimiento selectivo de cada bacteria.

En cada análisis se realizó:

a) Investigación de coliformes totales y coliformes fecales (*Escherichia coli*)

0'1mL y 1mL del agua de cada muestra se sembraron en tubos de Caldo Lactosado (casa Cultimed. Barcelona. España) de concentración normal y de doble concentración, manteniéndose 24 horas a 37°C. A partir de los tubos que presentaron gas en la campana Durham y turbidez en el medio, se tomaron muestras que se sembraron en medio eosina azul de metileno (medio Levine, casa Cultimed), incubándolos 24 horas a 37°C. De las colonias crecidas en este medio se procedió a su aislamiento y posterior identificación por las pruebas bioquímicas de Gram, Movilidad, Oxidasa, Catalasa, Rojo de metilo, Voges-Proskauer, Nitratos, O/F, Citrato, Indol, Lisina, Ornitina, Glucosa, Lactosa, Manitol y Sorbitol. (Al-Jebouri; Tropolle 2) (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Avila. 6) (Borrego. 7) (Edberg. 14).

b) Investigación de *Clostridium* sulfito-reductores.

20mL del agua de cada muestra se sembraron en tubos que contenían el medio Agar Sulfito-Polimixina-Sulfodiácina (Agar SPS, casa Pronadisa. Madrid. España) licuado, añadiéndose a continuación parafina estéril para crear un ambiente de anaerobiosis. Se incubaron 48 horas a 37°C, considerándose valor positivo el crecimiento de colonias negras. (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Borrego. 7) (Hobbs. 16).

c) Investigación de *Salmonella*.

Se empleó el medio de enriquecimiento caldo Rappaport-Vassiliadis (casa Cultimed), sembrándose 5 mL de muestra en 5 mL de caldo, incubándose 24 horas a 37°C. Posteriormente se sembró a partir de este caldo el medio selectivo Agar *Salmonella*-Shigella (agar SS, casa Cultimed), siendo colonias típicas las de color negro con halo transparente, realizándose posteriormente las pruebas bioquímicas de Gram, Movilidad, Oxidasa, Catalasa, O/F, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Indol, T.S.I., Citrato, Glucosa, Lactosa, Manitol y Sorbitol. (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Borrego. 7) (Monzón Moreno. 9) (Edberg. 15) (Moriñigo. 18) (Moriñigo. 19) (Moriñigo. 20) (Van Schothorst y Renaud. 23).

d) Investigación de *Staphylococcus aureus*.

Una vez recogida la membrana del aparato de filtración, se depositó en medio Chapman-Stone (casa Cultimed), incubándose 24 horas a 37°C. Ante la aparición de colonias sospechosas de color blanco o crema, fueron sembradas en medio Vogel-Johnson (casa Cultimed) a 37°C durante 24 horas tomándose como colonias típicas aquellas de color negro rodeadas de halo amarillo. Posteriormente se procedió a su aislamiento e identificación utilizando las pruebas bioquímicas de Gram, Movilidad, O/F, Oxidasa, Catalasa, DNAasa Nitratos, Arginina, Xilosa, Arabinosa y Sacarosa. (Alico y Dragonjac 1) (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Borrego. 7) (Borrego. 8) (Kloos y Schleifer. 17).

e) Investigación de *Enterococcus* o *Streptococcus* fecales del grupo D.

Tras la filtración, la membrana se colocó en medio Slatenz-Bartley (casa Cultimed), incubándose 24 horas a 37°C, y tomándose como colonias típicas las de color rosado o rojo. A partir de éstas, se aislaron y sembraron en medio Bilis-esculina (casa Cultimed) para identificar los *Enterococcus* manteniéndose a 37°C durante 24 horas y observando la aparición de colonias con color marrón oscuro o negro. Posteriormente se

procedió a su identificación bioquímica mediante las pruebas de Gram, Movilidad, Catalasa, O/F, Nitratos, Lactosa, Ramnosa, Sacarosa, Manitol y Sorbitol. (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Borrego. 7) (División Merck . 13).

f) Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*.

La membrana de filtración se depositó en Agar Pseudomonas (casa Cultimed), incubándose 24 horas a 37°C. Las colonias típicas, de color verde, se aislaron e identificaron bioquímicamente mediante las pruebas de Gram, Movilidad, Oxidasa, Catalasa, O/F, Nitratos, Gelatinasa, Arginina, Glucosa, Trealosa, Inositol y Sacarosa. (Alonso. 3) (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Borrego. 7) (De Vicente. 10) (De Vicente. 11) (De Vicente. 12)

g) Investigación de *Vibrio cholerae*.

La membrana de filtración se depositó en Agar Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa (Agar TCBS, casa Cultimed), incubándose 24 horas a 37°C y tomándose como colonias típicas las de color amarillo o verde. Se aislaron e identificaron por las pruebas bioquímicas de Gram, Movilidad, Oxidasa, O/F, Nitratos, Ornitina, Arginina, Gelatinasa, Citrato, Glucosa, Manitol, Sacarosa, Lactosa y Arabinosa. (APHA, AWWA & WPCF. 4) (Borrego. 7) (División Merck . 13).

RESULTADOS

Del estudio bacteriológico se han obtenido los resultados que se resumen en la tabla 1.

Se han tomado como referencia los límites máximos especificados en el BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990, relativa a la Reglamentación Técnico- Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. En él se especifica que el agua potable no debe presentar microorganismos patógenos ni fecales, siendo agua no potable aquella que los presente. (24).

DISCUSIÓN

La evaluación de los resultados nos permite concluir que en los puntos 1 y 3 no se puede considerar potable el agua de la muestra recogida, pues en el punto 1 aparece *Enterococcus*, y en el 3 aparecen todos los patógenos buscados excepto *Vibrio cholerae*, que son microorganismos prohibidos por la Legislación para ser considerada agua en buen estado microbiológico.

En el punto 2 se observa que no aparece ningún microorganismo patógeno, por lo que el agua se haya en buen estado microbiológico, aunque este óptimo estado del agua del río se modifica al llegar a la zona de la fosa séptica (punto 3), apareciendo entonces gran número de indicadores de contaminación, sin duda derivados de la filtración del contenido de la fosa al río.

Asimismo, esta filtración es la causante de que en el agua del balneario (punto 1) se haya encontrado el patógeno *Enterococcus*, microorganismo no habitual de las aguas naturales y que es causante de la contaminación que presenta el agua del balneario, que la convierte en no potable y no apta para el consumo público.

TABLA 1.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Bact. aerob. a 37°C	Presencia	Presencia	Presencia
<i>Enterococcus</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
<i>Clostridium</i>	Ausencia	Ausencia	Presencia
<i>Salmonella</i>	Ausencia	Ausencia	Presencia
<i>Ps. aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Presencia
<i>Staph. aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Coliform. totales	Ausencia	Ausencia	Presencia
Coliform. fecales	Ausencia	Ausencia	Presencia

Nota: El punto 1 se corresponde con la muestra tomada de las instalaciones del balneario. El punto 2 se corresponde con la muestra tomada de la zona del río situada 200 metros aproximadamente frente al balneario. El punto 3 se corresponde con la muestra tomada de la zona del río donde desemboca el agua de una fosa séptica cercana al balneario, aproximadamente a 100 metros de distancia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alico, R. K. & Dragonjac, M. F. (1986). Evaluation culture media for recovery of *Staphylococcus aureus* from swimming pools. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 699-702.
2. Al-Jebouri, M.M. & Tropolle, D.R. (1984). Indicator bacteria in freshwater and marine molluscs. *Hydrobiol.* 111: 93-102.
3. Alonso, J. L. (1989). Membrane filter procedure for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Wat. Res.* 23: 1499-1502.
4. APHA, AWWA & WPCF. (1985). Standart methods for the examination of Water and Wastewater. 16th Ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
5. Armijo, M.; Bacaioca, J. (1994). Curas balnearias y climáticas. Cap. 11. Pag. 143-155. Ed. Complutense. España.
6. Avila, M J. (1989). Comparative study of coliform enumeration media from seawater samples. *J. Microbiol. Meth.* 9: 175-193.
7. Borrego, J. J. (1992). Métodos microbiológicos rápidos para análisis de aguas y alimentos. Cap. 4, 8, 9, 11, 12. Universidad de Málaga. España.
8. Borrego, J. J. (1988). Comparative studies of selective media for recovery of *Staphylococcus aureus* from natural waters. *L. Appl. Bacteriol.* 65: 153-161.
9. C. Monzón Moreno (1986) *Salmonella* en aguas residuales: comparación de tres métodos de aislamiento. *Rev. Esp. Microbio. Clin.* Vol. 1, nº 5, 299-302. Colegio Universitario de Las Palmas. España.
10. De Vicente, A. (1986). Estudio de *Pseudomonas aeruginosa* en Aguas Naturales Contaminadas. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
11. De Vicente, A. (1986). Comparative study of selective media for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from water by membrane filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 832-840.
12. De Vicente, A. (1991). Relationship between *Pseudomonas aeruginosa* and bacterial indicators in polluted natural waters. *Wat. Sci. Tech.*, 24: 121-124.
13. División Merck (1994). Manual de Medios de Cultivo. España.
14. Edberg, S.C. (1990). Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 366-369.
15. Harvey, R. W. S.; Price, T.H. (1980). *Salmonella* isolation with Rappaport's medium after pre-enrichment in buffered peptone water using a series of inoculum ratios. *Journal of Hygiene.* 85: 125-128. Cambrige.
16. Hobbs, G. (1982). Detection and isolation of *Clostridium botulinum*. Methods for food poisoning organisms. (J.E.L. Corny, D. Roberts & F. A. Skinner, eds) pp. 151-162. Academic Press, London, U.K.
17. Kloos, W. E. & Schleifer, K. H. (1986). *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. (P.H.A. Sneath, N. S. Main, M. L. Sharpe & J. G. Holt, eds). Williams & Wilkins, co. Baltimore. pp. 1013-1035.
18. Moriño, M. A. (1986). Comparaty study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 169-176.
19. Moriño, M. A. (1989). Viability of *Salmonella* species in natural waters. *Curr. Microbiol.* 18: 267-273.
20. Moriño, M.A. (1989). Evaluation of different plating media used in the isolation of *Salmonellas* from enviromental samples. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 353-360.
21. Olivieri, V. P (1982). Bacterial indicators of pollution. En: *Bacterial Indicators of Pollution* (W.O. Pipes, ed.), pp. 21-41. CRC Press, Inc. BocaRaton.
22. Rheinheimer, G. (1987). Microbiología de las aguas. Cap. 15, pp. 233-239. Ed. Acribia, Zaragoza. España.
23. Van Schothorst, M. & Renaud, A. M. (1983). Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium. *Journal of Applied Bacteriology.* 54: 209-215.
24. BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990.
25. BOE número 193 del 13 de Agosto de 1983.
26. B.O.E. núm. 178 de 26 de Julio de 1991