



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Análisis
microbiológico de aguas
de distintas fuentes
públicas**

Alumno: Azucena Belmonte Mota

Septiembre/2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de aguas de distintas fuentes públicas

Alumno: Azucena Belmonte Mota

Septiembre/2015

ÍNDICE

1. Resumen / Abstract	5
2. Introducción	6
2.1. Biotopos.....	6
2.2. Microorganismos que encontramos en el agua.....	8
2.3. Trasmisión de enfermedades.....	11
2.4. Procesamiento y tratamiento	12
2.5. Control del agua.....	15
2.6. Seguridad y reglas del laboratorio.....	17
2.7. Legislación	17
3. Objetivos.....	21
4. Material y métodos.....	22
4.1. Recogida de muestras.....	22
4.2. Material utilizado.....	22
4.3. Medios de cultivo.....	23
4.3.1. Preparación de medios.....	24
• TSA (Agar Triptona Soja).....	24
• MRS, Agar (Medio Deshidratado).....	24
• MacConkey Agar.....	25
• KAA (Kanamycin Esculin Azide Agar).....	26
• VJ Agar (Vogel-Johnson Agar).....	26
4.4. Diluciones de las muestras en solución salina.....	29
4.5. Siembra.....	29
4.6. Incubación.....	30
4.7. Examen microbiológico.....	31
4.7.1. Recuento.....	31
4.7.2. Tinción de Gram.....	32
4.7.3. Prueba de la catalasa.....	33
5. Resultados y discusión.....	35

5.1.	Recuentos obtenidos en los distintos medios.....	35
•	Medio TSA.....	35
•	Medio VJ.....	36
•	Medio MacConkey.....	37
•	Medio MRS y KAA.....	39
5.2.	Elección de colonias para la identificación morfológica.....	40
5.3.	Identificación morfológica de las colonias.....	41
•	Prueba de la catalasa y tinción de Gram.....	41
5.4.	Comparativa entre las diferentes muestras.....	43
6.	Conclusiones.....	46
7.	Bibliografía.....	47
•	Legislación consultada.....	49
•	Páginas webs consultadas.....	49

1. RESUMEN

En este trabajo nos basamos en la recogida y análisis de muestras de distintas fuentes de agua, por el gran interés desde el punto de vista microbiológico que contiene esta, y por su importancia en la salud pública. Es un tema bastante serio que afecta a todos los seres vivos expuestos a los diferentes tipos de agua que se pueden llegar a consumir, ya que es posible que el consumo de agua contaminada pueda afectarnos, produciéndonos enfermedades, e incluso la muerte. Hemos trabajado en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Jaén, con diferentes muestras para realizar un control microbiológico mediante diferentes pruebas como recuento, tinción de Gram y prueba de la catalasa, para poder analizarlas con el fin de conocerlas y comparar unas con otras. Los resultados obtenidos muestran que las aguas recogidas en zonas públicas controladas son aptas para el consumo humano.

• ABSTRACT

In this work, we rely on the collection and analysis of samples from different water sources, by the great interest from a microbiological point of view containing this, and because of its importance in public health. It is a very serious issue that affects all living beings exposed to different types of water can consume, since it is possible that consumption of contaminated water can affect, with diseases, and even death. We worked on the microbiology laboratory of the University of Jaen, with different samples for microbiological control using different tests such as count, Gram stain and catalase test, to analyze them in order to know and compare with each other. The results show that the water collected in public areas controlled are fit for human consumption.

2. INTRODUCCIÓN

El agua es indispensable para la vida de todo ser vivo y por ello debemos conocer qué enfermedades son las causadas por microorganismos que pueden existir en el agua y que tipos de mecanismos existen para el tratamiento rutinario de estas, para poder combatir las posibles alteraciones del agua. Hay prestar gran interés en países en vías de desarrollo sobre todo, pero también en los países desarrollados, llevando un control muy estricto en aguas destinadas al consumo, es decir, las aguas potables.

El agua es un buen vehículo de transmisión de microorganismos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus Guías para la calidad del agua potable, la Directiva 98/83/CE¹ y otras normas internacionales, establecen o recomiendan los requisitos de calidad para el agua de consumo humano. La normativa decreta que es apta para el consumo si está libre de microorganismos patógenos de origen entérico y parasitario intestinal, dentro de los cuales existe una gran variedad de bacterias patógenas.

Debemos saber que estos microorganismos que viven en todo tipo de aguas no pueden ser reemplazados por su participación en los ciclos de nutrientes para la circulación de la materia, pero hay que tener en cuenta que esto, según su contenido, conlleva a impulsar el olor, sabor, corrosión de tuberías, etc.

2.1. Biotopos

Según los geógrafos, podremos hablar de aguas subterráneas, superficiales, continentales y mares, según condiciones físicas y químicas. Podemos ver diferencias muy significativas en la densidad de microorganismos en los distintos tipos de agua, las aguas subterráneas son pobres en la microflora, por su escasez de nutrientes, que afecta a animales y a vegetales. Por el contrario, las aguas superficiales son mucho más ricas en proporción que las subterráneas, incluyendo todo tipo de organismos.

Es muy importante conocer los diferentes biotopos, para poder conocer su microbiología:

-Las aguas subterráneas, las forman las precipitaciones, ríos, lagos, es decir, toda el agua que es filtrada hacia el interior de la tierra, hasta llegar a las capas impermeables, formando una capa acuífera. Hay que saber que es muy importante para la explotación agraria, ya que hace uso de este tipo de agua. Como sabemos, pueden recorrer muchos kilómetros y con ello variar su contenido mineral, pero como hemos dicho antes la cantidad de bacterias es muy pequeña, haciéndola valiosa como agua potable. Podemos encontrar agua estratificada, en capilares de los terrenos rocosos y agua de infiltración, que son las acumuladas en cavernas y cámaras, formando arroyos y lagos subterráneos.

-Aguas superficiales, en las que incluiríamos tanto las continentales como las oceánicas. Los denominados manantiales, provienen de las aguas subterráneas, y estos sustentan a ríos y lagos, los manantiales detríticos surgen a consecuencia del deshielo. Existen las llamadas fuentes que derivan de aguas subterráneas también, de terrenos porosos. Otra variedad son las aguas termales, derivadas de zonas volcánicas o de superficies muy profundas. Las fuentes pueden ser ricas en minerales, según las circunstancias geológicas, y además pueden ser; salinas, amargas, ferruginosas y sulfurosas. Las aguas ricas en cal forman depósitos calcáreos. En las fuentes dominan los microorganismos, algas y bacterias, según las condiciones ambientales y químicas.

Los ríos, se caracterizan por la geología y por las condiciones ambientales, pueden variar en la velocidad de la corriente, según el desnivel, en la vegetación de alrededor, anchura, profundidad, depende de la erosión del suelo, caudal, según las condiciones meteorológicas, precipitaciones, etc. Lo que predominan son los materiales en suspensión, que determina en parte la microflora, los cuales van a ir a parar a la desembocadura, creando así los deltas, los cuales son importantes para la microbiología. Suelen estar contaminados, mayormente por culpa de la población humana, siendo un factor crucial. Los organismos también se ven afectados por las características del río, a una mayor corriente, son menos productivas, hay una disminución de plancton, bentos, con una flora y fauna muy pobres.

Otro tipo de aguas son los lagos, estanques y pantanos, los lagos varían al igual que los otros tipos según las condiciones físicas, químicas, meteorológicas, etc. Existen lagos fluviales, se abastecen de ríos y lagos de aguas subterráneas. Los lagos pueden tener un agua estancada o darse corrientes muy fuertes. Los embalses son construcciones que sirven para economizar el agua o energía. En los ecosistemas acuáticos hay que tener en cuenta que según las turbulencias producidas, puede haber mezcla en todo el lago o estratificaciones, esto modifica la biología, además si son heterótrofos u oligotróficos, cambiará que en el fondo sea aerobio o anaeróbico y con ello los microorganismos. Los lagos salados, pueden variar según su concentración, representando biotopos extremos, poblados de pocas especies, bacterias, algas azules y flagelados. Algunos animales y vegetales solo pueden vivir exclusivamente en el mar. Este biotopo varía desde la plataforma continental, 200 metros de profundidad, hasta el mar abismal, que pueden superar los 2000 metros, en el cual impera la oscuridad. Las plantas verdes viven hasta los 200 metros. El 90% del mar está a una temperatura entre 5 y -1'5°C, en la cual tienen un papel importante los psicrófilos. Por otro lado encontramos, zonas próximas de fuentes termales submarinas donde la temperatura es de 300-400°C, donde predominan sulfobacterias quimioautótrofas. En el mar, gracias a las corrientes encontramos zonas donde asciende el agua, se desarrolla activamente el fitoplancton, lo que se traduce en riqueza de peces.

2.2. Microorganismos que encontramos en el agua

En el agua podemos encontrar muchísima diversidad de microorganismos, seres vivos microscópicos: bacterias, cianofíceas, hongos, algas y virus.

Las bacterias, fueron representadas por primera vez por Antonio Van Leeuwenhoek en 1683, como cocos, bacilos y espirilos. Pero el impulso al estudio fue por Luis Pasteur y Roberto Koch, que las encontraron en diferentes medios, incluyendo el agua. Podemos encontrar bacterias que son exclusivas, su hábitat es el agua y otras que pueden ser que provengan de otros biotopos, de la tierra, aire, animales, etc. Pueden sobrevivir en el agua, ya que se adaptan a ese medio o que se encuentren un tiempo determinado, como las causantes del cólera, tifus, disentería, colibacilos, etc. Como hemos dicho,

varía el tipo de bacterias según las características del agua. (Rheinheimer, 1987)

Las bacterias se engloban dependiendo de las sales inorgánicas, orgánicas, iluminación, oxígeno, temperatura, turbidez, si son aguas estancadas o no, etc. Estas pertenecen al Reino Mónera, las cuales se clasifican según el ADN o la morfología, pudiendo ser autóctonas o procedentes de otros biótopos, como tierra, lluvia o aire. (Tabla 1 y 2). (Galvin, 2003)

En las siguientes tablas podemos ver las bacterias presentes en el agua:

Eubacterias		
Cocos		
Grampositivos	Aerobios	<i>Micrococcus</i>
	Anaerobios	<i>Sarcina</i>
Gramnegativos	Aerobios	<i>Paracoccus, Lampropedia</i>
Bacilos sin esporas		
<i>Gramnegativos</i>		
Heterótrofos	Aerobios	<i>Pseudomonas, Zooglea, Azotobacter, Methylomonas Alcaligenes,</i>
	Anaerobios	<i>Photobacterium Fusobacterium</i>
Quimioautótrofos	Aerobios	<i>Nitrobacter, Thiobacillus</i>
Bacilos con espora		
Grampositivo	Aerobios	<i>Bacillus, Clostridium</i>
	Anaerobios	<i>Desulfomaculatum</i>
Células curvas o espirales		
Gramnegativa	Aerobias	<i>Vibrio, Bdellovibrio</i>
	Anaerobias	<i>Spirillum, Desulfovibrio</i>

Tabla 1. Bacterias presentes en las aguas (Galvín, 1996)

Bacterias de forma compleja

Fototróficas		
Bacterias púrpura		
Chromariaceae (donador de H: SH ₂)	Aerobios	<i>Chromatium, Thiocystis, Thiospirillum, Thiodictyon, Thiopedia, Ectothiorhospira</i>
Rhodospirillaceae (donadores de H: compuestos orgánicos)	Microaerófilas	<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium</i>
Clorobacterias (verde o marrón)		
Chlorobiaceae	Anaerobias	<i>Chlorobium, Prosthecochloris, Pelodictyon, Clathrochloris</i>
Bacterias vaginadas	Aerobias	<i>Sphaerotilus, Leptothrix</i>
Bacterias pediculadas	Aerobios	<i>Hyphomicrobium, Rhodomicrobium, Caulobacter, Gallionella, Nevskia</i>
Actinomicetos	Aerobio	
Bacterias corineformes (bacilos con extremos dilatados)		<i>Corynebacterium, Arthrobacter</i>
Actinomicetos genuinos (forman micelio y espora)		<i>Nocardia, Streptomyces, Actinoplanes</i>
Espiroquetas (células espirales con filamento axial)	Aerobia, anaerobia	<i>Spirochaeta, Cristispira, Treponema, Leptospira</i>
Micoplasma (bacterias polimorfas sin membrana celular)		<i>Thermoplasma, Metallogenium</i>
Bacterias reptantes (reptan sobre sustratos sólidos)	Aerobia, anaerobia	
Beggiatoaceae (filamentos de numerosas células en parte con granulos de azufre)		<i>Beggiatoa, Thioploca</i>
Cytophagaceae (bacilos o filamentos flexibles)		<i>Cytophaga, Sporocytophaga, Flexibacter, Flexithrix</i>
Leucothrichaceae (filamentos adheridos a sustratos sólidos)		<i>Leucothrix, Thiothrix</i>

Tabla 2. Clasificación de las bacterias presentes en las aguas y caracteres diferenciales más importantes de las mismas. “Manual de Bergey”

Como hemos comentado antes, existen diferentes enfermedades relacionadas con los microorganismos hídricos, tanto por sí mismo como por la producción de toxinas. Debemos de tener en cuenta que son diferentes las cantidades que se deben ingerir de cada bacteria patógena para producir una enfermedad. Una de las características relacionadas con la cantidad de microorganismos es la turbidez.

2.3. Transmisión de enfermedades

Como sabemos y hemos oído hablar miles de veces, el agua es un medio potencial de transmisión de enfermedades, por ello es muy importante relacionar el suministro de agua potable y salud urbana, el cual es un tema preocupante para la salud pública. Los patógenos pueden mantener diferentes tipos de asociaciones con organismos vivos, los cuales, pueden sobrevivir en el agua e infectar a personas, pudiendo tener graves problemas en personas inmunocomprometidas. (Tabla 3) (Pascual, 2000)

Organismo (bacterias)	Reservorio	Comentarios
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Vida libre	A menudo se asocia con gastroenteritis, celulitis y otras enfermedades
<i>Campylobacter</i>	Aves y otros animales	Causa principal de diarrea: común en aves de corral; microaerófilo
<i>Helicobacter pylori</i>	Vida libre, no conocido	Puede provocas gastritis tipo B, úlceras pépticas, adenocarcinomas gástricos
<i>Legionella pneumophila</i>	Vida libre, asociado con protozoos	Torres de refrigeración, evaporadores, condensadores, duchas y otras fuentes de agua
<i>Leptospira</i>	Animales infectados	Efectos hemorrágicos, ictericia

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	De vida libre y animales infectados	Es necesario un método complejo de recuperación, tuberculosis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vida libre	Oído del nadador y enfermedades relacionadas
<i>Salmonella enteritidis</i>	Tractos intestinales de animales	Común en muchas aguas
<i>Salmonella paratyphi</i>	Hombre y animal doméstico	Fiebre paratifoidea
<i>Salmonella thyphosa</i>	Hombre	Fiebre tifoidea
<i>Vivbrio Cholerae</i>	De vida libre	Presentes en muchas aguas y estuarios
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vida libre en aguas costeras	Causa diarrea en consumidores de marisco
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Frecuente en animales y en el medio ambiente	Gatroenteritis transmitida por el agua
<i>Shigella dysenteria</i>	Ser humano principalmente	Disenteria
<i>Proteus morganii</i>	Flora interstinal de hombres y animales	Diarrea
<i>Escherichia coli</i>	Intestino de los animales	Colibacilosis
<i>Pasteurella tularensis</i>	Animales	Turalemia

Tabla 3: Microbios patógenos de ambientes acuáticos. (Harley, 2004)

2.4. Procesamiento y tratamiento

La depuración es un método crucial para evitar las enfermedades transmitidas por el agua, consta de varios pasos, que pueden variar según las impurezas

del agua. (Imagen 1). Los suministros de agua municipal se depuran siguiendo una serie de pasos establecidos, aunque si las aguas vienen con gran cantidad de material en suspensión, es recomendable un paso previo por una balsa de sedimentación, donde sedimentan la arena y otras partículas gruesas. En los siguientes pasos se tiene que mezclar con sustancias químicas, alúmina y cal, dirigiéndose hacia una balsa de precipitación, donde se vierten mas materiales, denominado coagulación o floculación y donde se eliminan microorganismos, materia orgánica, contaminantes tóxicos y partículas finas en suspensión. Después de estos pasos, aún se depura más el agua en una unidad de filtración. Los filtros rápidos de arena, que se basan en la captación física de partículas finas y flóculos, se utilizan a menudo para este propósito. Esta filtración elimina hasta el 99% de las bacterias restantes. Después de la filtración, el agua se trata con un desinfectante. Este paso suele consistir en cloración, aunque la ozonización se está extendiendo cada vez más. Cuando se emplea la cloración, la dosis de cloro libre residual a una concentración de 0,2 a 2,0 mg/litro. Un problema que resulta de este método son los productos secundarios de la desinfección, como los trihalometanos (THM), que se forman cuando el cloro reacciona con la materia orgánica. Algunos de estos compuestos pueden ser cancerígenos. (Walter, 2003)

La depuración anteriormente descrita elimina o inactiva eficazmente las bacterias patógenas y los organismos indicadores (coliformes). Sin embargo, y por desgracia, este sistema con coagulantes, filtración rápida en arena y desinfección química no elimina de forma constante y segura los cistos de *Giardia lamblia*, oocistos de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y virus. Actualmente, se considera al género *Giardia* como agente etiológico de diarrea, “enfermedad del viajero”, que se transmite por agua de río o arroyo sin tratar. La eliminación más fiable es la de filtros lentos de arena, que comprende el paso del agua a través de un lecho de arena en el que la superficie de cada grano está cubierta por una capa microbiana. Se trata de un proceso más biológico que físico. Los microorganismos transmitidos por el agua se eliminan al adherirse a la capa microbiana de la superficie.

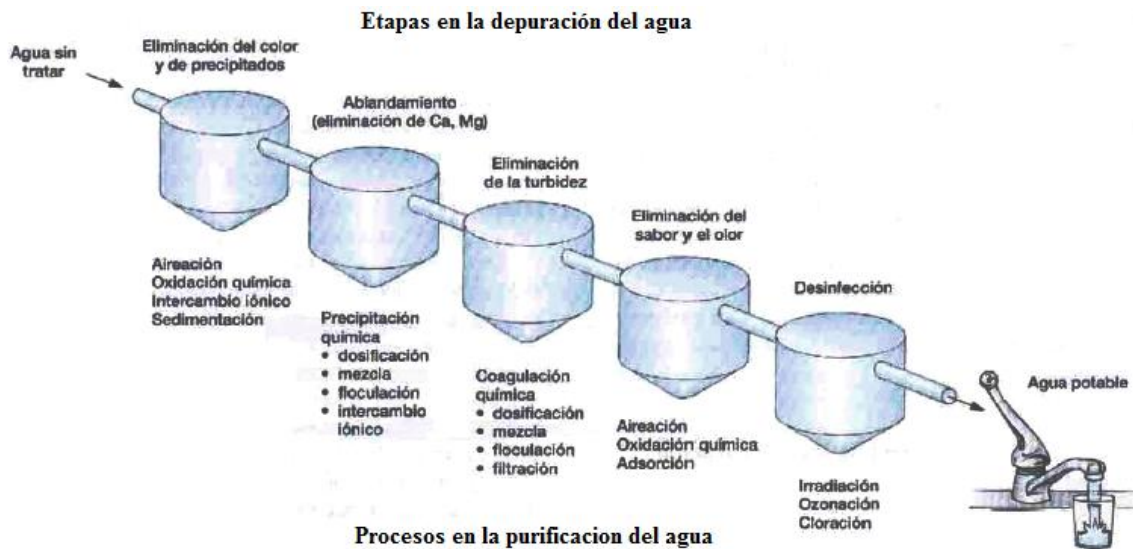


Imagen 1. Depuración del agua. (Harley, 2004)

Existen muchos estudios de los diferentes tratamientos y los resultados dependen de diferentes factores como el medio ambiente, parámetro físico-químico y las técnicas analíticas aplicadas. (Anon, 1993)

Lo más importante a mencionar es la necesidad de eliminar todo aquel patógeno que sea perjudicial, aunque cada vez va siendo más difícil por la demanda que esta tiene, también debe de tener el agua una cierta calidad lo que a menudo requiere más de un tratamiento. (ICMS, 2000).

En la potabilización, algunas bacterias y otros microorganismos intervienen en el tratamiento de las aguas ya que pueden ayudar a eliminar ciertas sustancias en los filtros de arena. Al aislar materia orgánica serán depredadas por protozoos, estos no pasan a través del filtro por su gran tamaño. Tenemos que destacar la existencia de *Streptomyces* en aguas potables, que provoca olor y sabor.

En aguas residuales podemos encontrar microorganismos como *Pseudomonas*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Aerobacter cloacae* y *Zooglea ramígera*, también es común enterobacteriáceas como *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* y *Streptococcus faecalis*, *Sphaerotilus natans*. Si son fuertemente orgánicas aparte de *Saccharomyces*, *Cándida* y *Rhodotorula*, encontraremos numerosos hongos y levaduras. En las aguas urbanas e

industriales encontramos bacterias desnitrificantes y otras. En vertidos agrícolas veremos la presencia de *mixobacterias*.

Los vertidos de aguas residuales domésticas a un cauce natural provocan un aumento de determinadas bacterias y la disminución de las bacterias autóctonas del río, para su tratamiento necesitamos de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR).

Otro tipo de tratamiento es la digestión anaerobia por parte de las bacterias, utilizada en depuración de aguas industriales, mediante un proceso donde la materia orgánica contenida en un fango activo es escasamente mineralizada, y se podrá utilizar como fertilizantes o aditivos de compostajes, etc.

La desinfección de las aguas es necesaria para la potabilización, eliminación de cualquier microorganismo patógeno, y para ser consumida sin poner en riesgo la salud ni la vida. Esto ha conllevado con el paso del tiempo a más controles, tratamientos, y deberes, por parte de las instituciones, que dan lugar al saneamiento del agua con el fin de disminuir la tasa de mortalidad.

2.5. Control del agua

La calidad y seguridad del agua viene determinada por el control y estudio de diferentes criterios como pueden ser:

- Origen: evitar la contaminación de aguas subterráneas por contaminantes ambientales. Esto adquiere mucha relevancia en el caso de las aguas que no se purifican ni se someten a tratamientos bactericidas.

- Bombas, tuberías y depósitos: son muchas veces los causantes de la contaminación si el mantenimiento, velocidad de flujo es baja o el tiempo de almacenamiento largo. Los recuentos tendrán un incremento debido al crecimiento microbiano. También es importante la contaminación por la manipulación manual.

- Envases: las botellas de plástico o los tapones se fabrican a temperaturas muy altas y con ello se evita la concentración bacteriana. El problema viene con el uso de botellas de vidrio recicladas que pueden ser un importante punto de riesgo si no han sido manipuladas correctamente o su limpieza es insuficiente.

-Aire: se debe fluir en las botellas, debe filtrarse y los filtros preservarlos de la contaminación. (Ahmed, 2006).

-Planta embotelladora: en la planta deben aplicarse prácticas higiénicas y los criterios de la HACCP como parte de un sistema de control general. Cuando el agua reciba un tratamiento bactericida, la eficacia de este debe controlarse y monitorizarse. Las aguas carbonatadas deben contener como mínimo 250mg/l de CO₂ libre. Si los aceites lubricantes no se tratan con agentes biocidas, pueden constituir una fuente secundaria de contaminación al igual que las obras de mantenimiento de la red cuando no se toman las debidas precauciones. Los análisis microbiológicos de las aguas embotelladas son de valor limitado, sobre todo cuando la mercancía está ya en la cadena de distribución, porque los resultados son difíciles de interpretar. Cuando se tengan que establecer criterios microbiológicos, deben diferenciar las aguas que reciben un tratamiento bactericida o las que se han carbonatado de aquellas que no han sido tratadas. Además, ha de considerarse el origen del agua y el punto de análisis. Finalmente, es también importante el punto de muestreo. El “Code of Hygienic Practice for Mineral Water” ofrece criterios microbiológicos para *E. Coli* y otros coliformes y estreptococos fecales. La presencia de tales bacterias en el origen o durante la comercialización indica una contaminación inicial de agua o una recontaminación debida a prácticas poco higiénicas durante el embotellado. (Codex Alimentarius commission, 1994)

El análisis de las aguas embotelladas no tratadas para el recuento total de aerobios solo es de relevancia si el agua se analiza en el origen y en las 12 horas siguientes al envasado siempre que las botellas se hayan mantenido refrigeradas a 4°C. Como los microorganismos aerobios pueden crecer en el agua embotellada, tales análisis no deben realizarse de muestras tomadas de botellas almacenadas o que estén en la red de distribución. (Roberts, 1999)

Los coliformes son indicadores de buenas prácticas de fabricación en el caso de las aguas embotelladas tratadas. (Ahmed, 2006)

2.6. Seguridad y reglas del laboratorio

Para comenzar a trabajar en el laboratorio hay que saber dar un buen uso de él, conociendo todos los instrumentos necesarios, revisando los materiales para contrastar que todo está en perfecto estado y que funciona adecuadamente para que no afecte a la hora de hacer el estudio. Debemos tener cuidado con las medidas de seguridad y frente a emergencias que puedan ocurrir. (Gamazo, 1995)

La microbiología de aguas implica el estudio de los microorganismos que causan enfermedades, por eso hay que tener especial cuidado para la no difusión de las diferentes enfermedades a las distintas muestras con las que estamos trabajando en el laboratorio. (Inglis, 1991)

El análisis de agua es muy importante para saber si la técnica utilizada, tratamiento o depuración, es eficiente para la salud. En el laboratorio, hay que elegir correctamente el tipo de medio a utilizar, sabiendo qué tipo de microorganismos nos podemos llegar a encontrar y que pueden crecer en los diferentes medios. (ICMS, 2000).

2.7. Legislación

La complejidad y especificidad de las normas y regulaciones relativas a las aguas ha dado lugar a que pueda hablarse con propiedad de una disciplina diferenciada que podría denominarse Derecho de Aguas. (Agencia del agua)

En este apartado vamos a reflejar toda la legislación aplicable en nuestro país clasificada en tres grandes ámbitos: Europeo, Estatal y Autonómico.

De mayor a menor generalidad, las instancias públicas que participan en la gestión del agua son:

Unión Europea

La Unión Europea establece el marco general de actuación para los estados miembros. El instrumento primordial de la UE en materia de política de aguas es la Directiva Marco de la Política del Agua (2000/60/CE) del Parlamento Europeo y el Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la cual se establece un

Marco Comunitario de actuación en materia de Política del Agua (DOCE nº L327, de 22 de diciembre).

Entre los principios generales de la Directiva destacan los siguientes:

"El Agua no es un bien comercial como los demás, sino un Patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal".

- Exigencia de afrontar la calidad ecológica de las aguas comunitarias.
- La gestión y protección integrada de las aguas superficiales y subterráneas.
- El uso responsable y la conservación de los Humedales.
- Desarrollar una política comunitaria integrada del agua, acorde con el principio de subsidiariedad.

España

En España, según la Constitución, el Estado tiene la competencia exclusiva en materia de legislación y ordenación de recursos y aprovechamientos hidráulicos cuando las aguas discurran por más de una Comunidad Autónoma, mientras que las Comunidades Autónomas pueden asumir competencias sobre los aprovechamientos hidráulicos de interés de la Comunidad Autónoma.

Legislación Nacional

-Real Decreto 140/2003, de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE 45 del 21/02/2003) (Dirección General de Salud Pública y Participación, 2005)

Artículo 27.7 del Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, en relación al incumplimiento de los valores paramétricos de los parámetros del Anexo I parte C, y la actuación de los gestores ante estos incumplimientos. La calificación de la muestra de agua analizada, si solo incumple los parámetros de la parte C, se calificará como "agua apta para el consumo con exceso o con incumplimiento en...". Si los valores cuantificados de los parámetros de la parte

C superan los valores consensuados en este documento, la muestra se calificará como “agua no apta para el consumo”.

-BACTERIA COLIFORMES: Código del parámetro 031.

Valor paramétrico en el RD 140/2003 de 7 de febrero: 0 UFC/100 ml.

Recomendación: En cuanto se supere el Valor paramétrico (VP) hay que tomar medidas correctoras, se recomienda que a partir de 10 UFC/100 ml las medidas correctoras sean de rápida aplicación.

La presencia de bacterias coliformes está relacionado con el mantenimiento incorrecto de la red de distribución y/o instalación interior.

Indica posible presencia de otra contaminación microbiológica. En la práctica cuando los niveles de bacterias coliformes lleguen a 100 UFC/100 ml, podría haber de contaminantes fecales como *E coli*, y por tanto sería no apta por otros parámetros. El valor consensuado para calificar como no apta para el consumo un agua por este parámetro: 100 UFC/100 ml.

-RECuento DE COLONIAS A 22°C: Código del parámetro 032

Valor paramétrico en el RD 140/2003 de 7 de febrero: 100 UFC/ ml.

Recomendación: En cuanto se supere el VP hay que tomar medidas correctoras:

-A salida de tratamiento: se recomienda que a partir de 100 UFC/ml las medidas correctoras sean de rápida aplicación, ya que significa que ha habido una mala desinfección.

-En la red de distribución y grifo: se recomienda que cuando existan cambios anómalos, las medidas correctoras sean de rápida aplicación. Se considerarán cambios anómalos, valores superiores al doble del valor medio de al menos los tres últimos años en la red.

Valor consensuado para calificar como no apta para el consumo un agua por este parámetro: 10.000 UFC/ ml.

Todas estas normas vienen complementadas o rectificadas por diferentes órdenes:

- Orden SCO 1591/2005, de 30 mayo sobre el sistema de información nacional de aguas de consumo. (BOE 131 del 2/06/2005)
- Orden SAS 1915/2009, de 8 de julio, sobre sustancias para el tratamiento del agua destinada a la producción de agua de consumo humano.
- Orden SSI/304/2013, de 19 de febrero, sobre sustancias para el tratamiento de agua destilada a la producción de agua de consumo humano.
- Orden SCO, de 17 de marzo, sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano.

Ayuntamientos

Finalmente, los ayuntamientos de los municipios y poblaciones, que disfrutan del mayor grado de proximidad con el ciudadano, son responsables de la distribución y suministro del agua desde los depósitos municipales hasta los hogares, así como de la conducción de las aguas residuales hasta las plantas depuradoras.

3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar la calidad microbiológica de diferentes aguas procedentes de distintas fuentes públicas.
2. Analizar la presencia de distintos grupos bacterianos en las muestras de agua.
3. Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados de las aguas.
4. Comparar las muestras y determinar que muestras de agua son aptas para el consumo tras un análisis bacteriológico mediante un proceso de recuento en placa.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Recogida de muestras

El estudio llevado a cabo se basa en la recogida de muestras y su análisis. Hemos obtenido diecisiete ejemplares de distintas fuentes y lugares, para poder compararlos. Las tomas se han hecho durante diferentes semanas, para no acumularlas en el laboratorio y procesarlas poco a poco. Se tomaron las muestras en condiciones asépticas, con material limpio y siempre desechando la primera salida de agua de los conductos cerrados. Las muestras ensayadas son las siguientes:

Muestra1: Aguas Nuevas (Albacete)	Muestra 10: Depuradora
Muestra 2: Fuente Pinar (Albacete)	Muestra 11: Camino del canal
Muestra 3: Empresa (Albacete)	Muestra 12: Parque de la cañada
Muestra 4: San Isidro	Muestra 13: Pozo Jaén
Muestra 5: Pozo de la ermita	Muestra 14: Canal (Trasvase Tajo-Segura)
Muestra 6: Camino Sisante	Muestra 15: Parque viejo
Muestra 7: Fuente Fuensanta	Muestra 16: Fuente de Sisante
Muestra 8: Grifo río	Muestra 17: Fuente Pozoamargo
Muestra 9: Agua del río	

4.2. Material utilizado

Para trabajar con las muestras se ha utilizado material del laboratorio, siempre comprobando que está estéril para evitar contaminación externa de las muestras o previamente autoclavado en el laboratorio. El material utilizado ha sido el siguiente:

Placa de Petri	Mechero Bunsen	Peróxido de hidrógeno
Embudo	Estufa de cultivo (37°C)	Agua destilada
Matraz aforado	Autoclave	Alcohol del 96%
Balanza	Baño termostático	Asa de siembra
Cuchara	Microscopio óptico	Micropipetas
Bagueta	Lugol	Puntas estériles
Porta objetos	Cristal violeta	Cámaras refrigeradas
Gradillas	Safranina	Microscopio
Probeta		

4.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el análisis microbiológico son selectivos y no selectivos. Un medio no selectivo o general, el cual es nutritivamente muy rico que se emplea para enumerar la Microbiota total. Y medio selectivo utilizado para el crecimiento de microorganismos de interés, seleccionados, e impide la multiplicación de microorganismos competidores. Los agentes selectivos son componentes esenciales de estos medios.

Trabajaremos con medios de cultivo deshidratados, medios comerciales, los cuales deben de ser siempre del mismo fabricante para que no haya alteraciones en los resultados (Imagen 2). Debemos de tener los medios en buenas condiciones; los botes de fábrica, cerrados, sabiendo la fecha de caducidad, etc. A la hora de poner los medios en las placas (13 mililitros aproximadamente) tener cuidado con la temperatura para que en las placas no quede vapor, ya que esto sería un problema al no estar transparente la placa y no visualizar bien las colonias y además ese vapor podría contaminar las muestras. Una vez tengamos todos los medios en las placas, los dejamos

enfriar y a continuación se dejarán en la cámara fría hasta el momento de su utilización.

Las placas tienen que venir en una bolsa cerrada y esterilizada, para que no exista contaminación posible y solo deben abrirse al lado del mechero para que el ambiente de alrededor de la placa sea lo más estéril posible.

4.3.1. Preparación de medios

Primero preparamos los matraces, utilizamos matraces de un litro cada uno, en los cuales escribiremos el nombre en cada matraz para que no haya equivocaciones.

A continuación pesaremos los gramos que necesitamos, (según disponga el comerciante en el bote) lo echaremos al matraz y los llenaremos cada uno con la cantidad de agua destilada necesaria.

Los medios de cultivo para la siembra de las distintas muestras son:

TSA (Agar Triptona Soja)

Medio de cultivo general, utilizado para todo tipo de microorganismos, su importancia nutricional es el contenido de peptona de soja y de caseína, eficaz en el crecimiento de numerosos microorganismos. Su contenido es:

- ✓ Agar15,0 g
- ✓ Cloruro sódico 5,0 g
- ✓ Soytona (digerido de harina de soja con papaína)5,0 g
- ✓ Triptona (digerido de caseína con jugo pancreático)15,0 g
- ✓ pH final es de 7,3 a una temperatura de 25°C

Preparación: suspender 40gramos de Agar base TSA en 1 litro de agua destilada o desionizada, mezclar y esterilizar en autoclave.

MRS, Agar (Medio Deshidratado)

Medio selectivo para el recuento de *Lactobacillus* y bacterias ácido lácticas. Contiene una buena fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios gracias a la peptona y glucosa, por otro lado, el monoleato de sorbitán,

magnesio, manganeso y acetato aportan cofactores e inhiben a ciertos microorganismos y el citrato de amonio inhibe a las Gram negativas.

- ✓ Proteosa peptona10,0g
- ✓ Extracto de carne8,0g
- ✓ Extracto de levadura4,0g
- ✓ Glucosa20,0g
- ✓ Monoleato de sorbital..... 1ml
- ✓ Fosfato dipotásico2,0 g
- ✓ Acetato de sodio5,0g
- ✓ Citrato de amonio2,0g
- ✓ Sulfato de magnesio0,2g
- ✓ Sulfato de manganeso0,05g
- ✓ Agar13,0g
- ✓ pH final será de 6,2-6,6

Preparación: se necesita 62 gramos por un litro de agua destilada, mezclándolo bien y esterilizar como en los demás medios.

MacConkey Agar

Medio selectivo por contener sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias no entéricas. Es también un medio diferencial porque contiene lactosa y un indicador de pH. Las bacterias capaces de fermentar este azúcar producirán un cambio en el pH del medio por liberación de productos ácidos. Como consecuencia sus colonias aparecerán de color violeta, contrastando con la coloración amarillenta de las colonias de bacterias incapaces de fermentar la lactosa. Conteniendo:

- ✓ Lactosa10,0g
- ✓ Peptona de caseína3,0g
- ✓ Sales biliares1,5g
- ✓ Peptona de gelatina17,0g
- ✓ Rojo neutro0,03g
- ✓ Sodio Cloruro.....5,0g
- ✓ Violeta cristal.....0,001g

- ✓ Agar13,5g
- ✓ pH final es de 6,9-7,3

Preparación: suspender gramos de MacConkey Agar en 1 litro de agua destilada o desionizada, mezclar muy bien y esterilizar en autoclave.

KAA (Kanamycin Esculin Azide Agar)

Este medio de cultivo nos ayuda para confirmar la existencia de Enterococos. La kanamicina sulfato y la azida sódica inhibe el crecimiento de las demás bacterias. Estos microorganismos hidrolizan la esculina con la producción de glucosa y esculetina, la cual reacciona con el amonio de hierro (III) citrato para dar un complejo de color variable entre el verde y el negro. Conteniendo:

- ✓ Triptona20,0g
- ✓ Extracto de levadura.....5,0g
- ✓ Cloruro sódico5,0g
- ✓ Citrato de disódico1,0g
- ✓ Esculina1,0g
- ✓ Citrato de amonio de hierro0,5g
- ✓ Ácido sódico0,15g
- ✓ Sulfato de kanamicina0,02g
- ✓ Agar10,0g
- ✓ pH final es de 6,8 a 7,2

Preparación: se necesitan suspender 48gramos en un litro de agua destilada, mezclar y esterilizar en el autoclave.

VJ Agar (Vogel-Johnson Agar)

Se utiliza para identificar los Estafilococos manitol-positivos, estos reducen el telurito a teluro metal. La presencia de Litio Cloruro, de Glicina y del Potasio Telurito dan a este medio una fuerte acción selectiva donde la flora secundaria es inhibida. Contiene:

- ✓ Extracto de levadura5,0g
- ✓ Glicina10,0g
- ✓ Litio de cloruro5,0g

- ✓ Manitol10,0g
- ✓ Dipotasio Hidrogeno Fosfato.....5,0g
- ✓ Rojo de Fenol.....0,025g
- ✓ Triptona10,0g
- ✓ Agar15,0g
- ✓ pH de 7,0 a 7,4

Preparación: Suspender 60 gramos de VJ en un litro de agua destilada, mezclar bien y a continuación esterilizar. (Forbes, 2009)

Todos ellos de Scharlab (Barcelona), preparados según las instrucciones del fabricante.

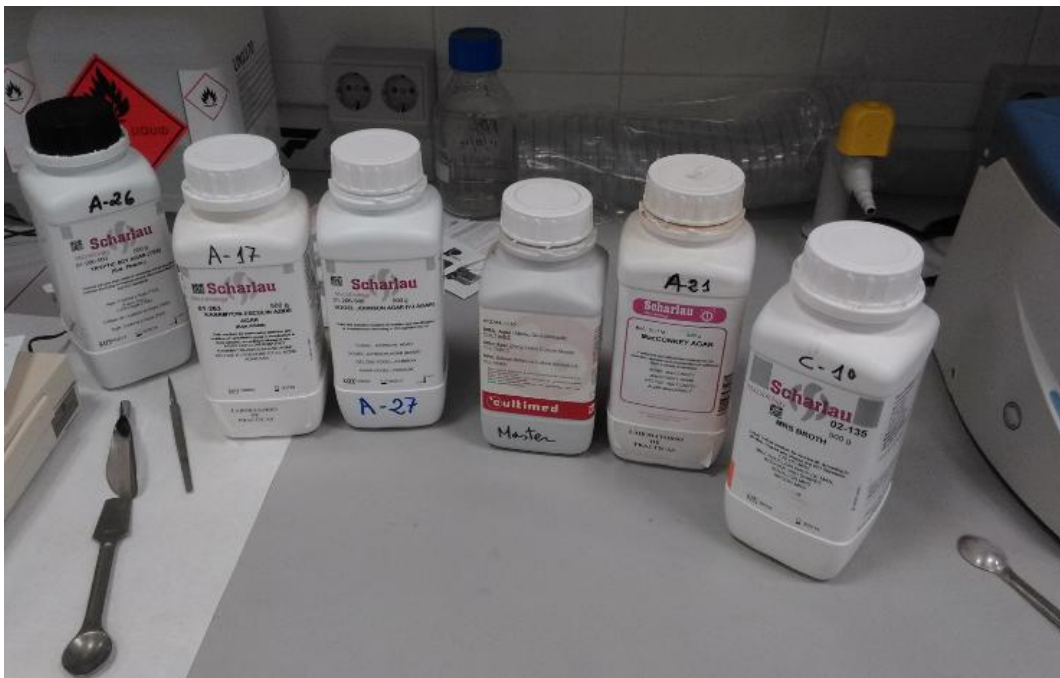


Imagen 2. Medios de cultivo deshidratados.

Cuando tenemos todos los medios en los matraces, los taparemos con algodón esterilizado y le pondremos papel de aluminio (Imagen 3) para meterlos en el autoclave.



Imagen 3. Medios de cultivo hidratados.

El autoclavado es muy importante para la esterilización de los medios después de haberlos rehidratado, donde los tendremos de veinte minutos a 120°. Con lo cual confirmamos la esterilidad y la ausencia de microorganismos y esporas.

A continuación sacaremos los matraces del autoclavado, dejándolos en el baño a 44-46°C, (Difco, 1998), prepararemos las placas de Petri necesarias para verter el contenido de los matraces en las placas, a razón de 15ml por placa. (Imagen 4).



Imagen 4. Placas de Petri con el medio de cultivo.

Para el medio TSA necesitaremos tres placas por muestra, para hacer diluciones, de la 0, en nuestro caso el agua que es nuestra muestra a analizar, -1, -2 y -3 solo haremos estas diluciones por el simple hecho de que trabajamos con agua.

En los demás medios, selectivos, necesitaremos dos placas por cada muestra a seguir, con las que solamente haremos diluciones 0 y -1.

Después de verter cada medio en las placas correspondientes debemos rotular correctamente cada una de ellas con un rotulador permanente, esto nos asegura que no se borre el nombre. Deben ir bien marcadas, este paso es muy importante para luego no tener fallos a la hora de la siembra.

4.4. Diluciones de las muestras en solución salina

La solución salina al 0.9 % se prepara con cloruro sódico y agua destilada (0,9g/100ml). (Imagen 5). Se preparan diluciones seriadas de cada muestra añadiendo 100µl de esta suspensión madre sobre 0,9ml de solución salina estéril.

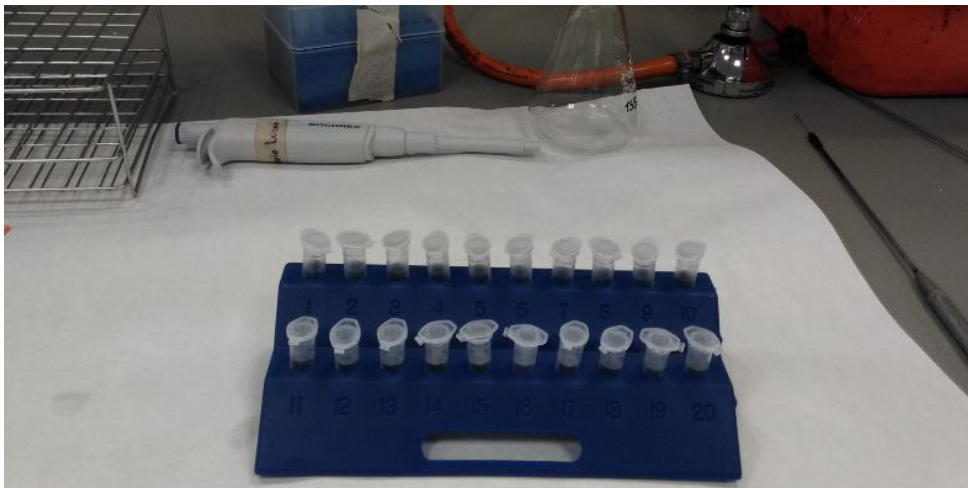


Imagen 5. Eppendorf con la solución salina.

4.5. Siembra

Una vez recogidas en diferentes botellas y tarros las muestras a analizar, las marcaremos antes de empezar, tanto las botellas de agua como todas las placas, en total tenemos por cada muestra, cuatro placas para las diluciones 0,

-1, -2 y -3 del medio TSA. Para los medios MRS, MacConkey, KAA y Vogel-Johnson solo tendremos dos placas, 0 y -1.

Debemos de rotular las placas, se escribe en el borde, claro y en tamaño más pequeño para no dificultarnos a la hora del conteo, con nuestro nombre o siglas, número de la muestra, medio de cultivo que es y la dilución que le corresponda.

Encenderemos el mechero, prepararemos el agua, las pipetas, la micropipeta, las placas, el asa de siembra y las diluciones salinas.

Para la siembra comenzamos cogiendo 100µl de agua con la micropipeta y lo echaremos en la solución salina 10^{-1} , cambiaremos la pipeta porque vamos a ir de una solución más concentrada a una menos concentrada y seguiremos diluyendo, de la solución 10^{-1} a la 10^{-2} , haremos lo mismo de la 10^{-2} a la 10^{-3} .

Después de haber preparado las diluciones, preparamos las placas, de la menos concentrada, 10^{-3} a la más concentrada, la suspensión madre, así no hará falta cambiar la pipeta. Cogeremos unos 100µl de la solución salina y la sembraremos en su correspondiente placa con ayuda de un asa de siembra triangular. El asa de siembra la flamearemos cada vez que cambiemos de muestra, ya que pasa lo mismo que con las pipetas, si vamos sembrando de la menos concentrada a la más concentrada no hace falta flamear entre siembra y siembra de cada placa con una misma muestra. Todo esto lo llevaremos a cabo para cada muestra.

4.6. Incubación

Los microorganismos varían en su facultad de crecer a diferentes temperaturas, en este estudio de microbiología de aguas es necesaria una temperatura de 37°C para los medios TSA, VJ, KAA y Mac Conkey, una temperatura de 30°C para el medio MRS donde crecen los lactobacilos. Cuando tengamos todas las muestras sembradas las llevaremos a incubarlas entre 24-48 horas para posteriormente hacer un recuento de las colonias obtenidas. Las placas se deben colocar invirtiéndolas, porque si las colocamos sin invertirlas, el agua que se condensa cae a la superficie y puede contaminar la muestra.

4.7. Examen microbiológico

Después de su incubación, a las 24 y 48 horas, haremos el recuento, la tinción de Gram y la prueba de la catalasa, para ver así de que bacterias se tratan y poder comparar.

4.7.1. Recuento

El recuento se llevará a cabo después de 48 horas de la incubación para darle tiempo a las colonias a crecer, ya que a las 24 horas no observaremos cambios sustanciales y los resultados no serán óptimos. Inicialmente tendremos en cuenta aquellas placas que tengan más de 30 y menos de 200 colonias. Se cuantifica el número de bacterias y se expresa como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml), presentes en una unidad de volumen o peso de la muestra:

$$UFC = \frac{N^{\circ} colonias}{Factor\ de\ diluccion} \times 10$$

El recuento lo haremos con ayuda de un bolígrafo o lápiz para ir marcando las colonias y no equivocarnos. Hay que tener cuidado porque hay muchas veces que las colonias crecen muy juntas y es muy difícil de contar.

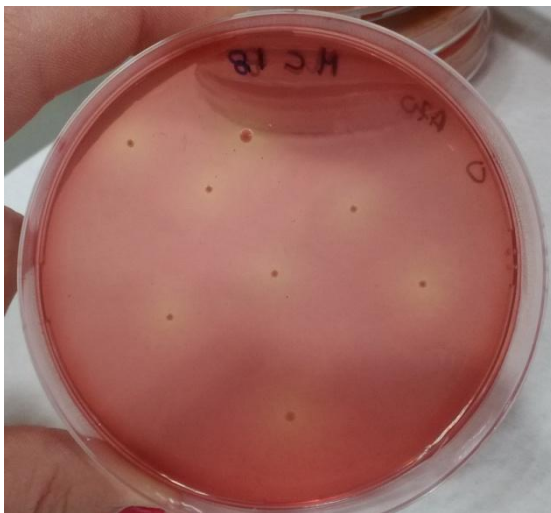


Imagen 6. Medio MConkey

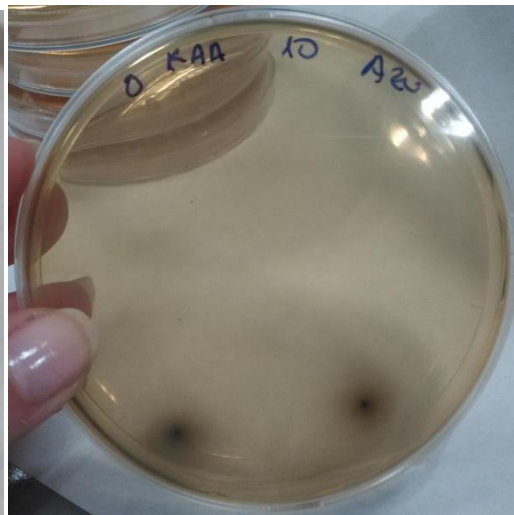


Imagen 7. Medio KAA

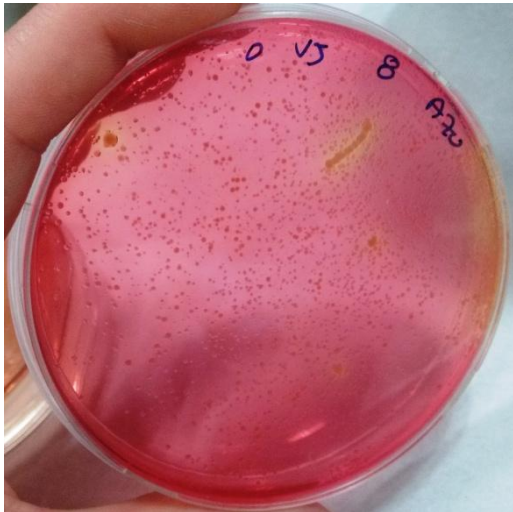


Imagen 8. Medio VJ

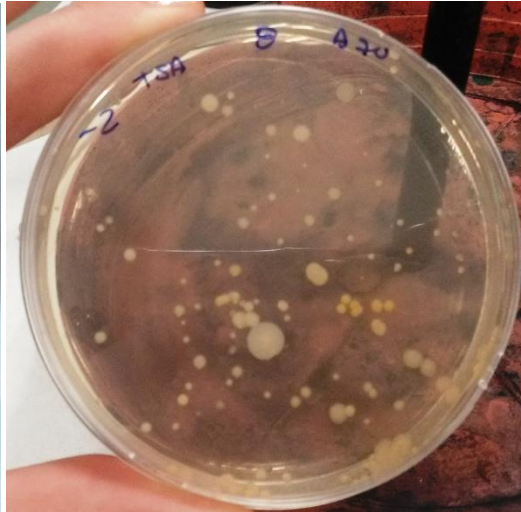


Imagen 9. Medio TSA

4.7.2. Tinción de Gram

Necesitamos tres colorantes: cristal violeta, Lugol y safranina; y también alcohol de 96°. Se utiliza para poder distinguir las bacterias Gram positivas de las Gram negativas.

Primero pondremos una gota de agua sobre un porta y cogeremos una colonia de las placas ya contadas anteriormente. Tenemos que secar, fijar y enfriar para poder teñir la colonia y a continuación comenzaremos a teñir.

Se vierte el cristal violeta sobre la muestra y se deja actuar dos minutos. Es un colorante básico y lo que hace es que en contacto con células cargadas negativamente, se colorean.

Al pasar los dos minutos se escurre el exceso de colorante y se añade Lugol, el cual mantendremos otros dos minutos y este lo que hace es retener el colorante antes añadido.

Habrà que decolorar con alcohol de 96°, treinta segundos y posteriormente hay que lavar suavemente con agua destilada.

Por último se cubre con safranina, durante tres minutos actuando y se lavará. Este colorante es básico y será el que hará que se distingan las bacterias,

según el color, las Gram negativas quedarán de un color rosáceo (Imagen 10) y las Gram positivas de azul-violeta (Imagen 11).

Al lavarlo se secará al aire libre para poder observar al microscopio y obtener los resultados.

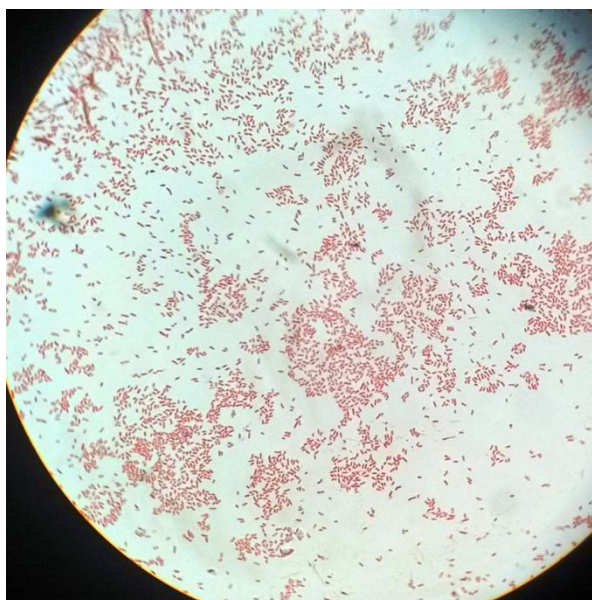


Imagen 10. Bacilos (Gram -)

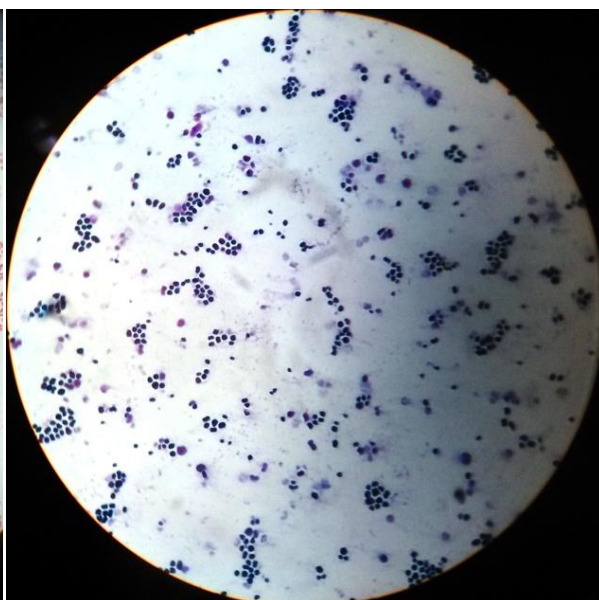
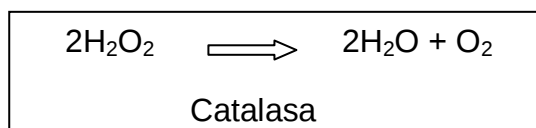


Imagen 11. Cocos (Gram +)

4.7.3. Prueba de la catalasa

Es necesario un porta objetos, una colonia y agua oxigenada (H_2O_2). Se hace con todas las diferentes colonias de los distintos medios que tengamos, para dar como positivo (imagen 12) o negativo la presencia de la enzima catalasa. Si la bacteria posee la enzima catalasa se observaran burbujas, porque lo que hace es descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.



La prueba de la catalasa nos indicará si hay presencia de dicha enzima, donde veremos si es positiva que aparecerán burbujas y si el resultado es negativo no aparecerán.

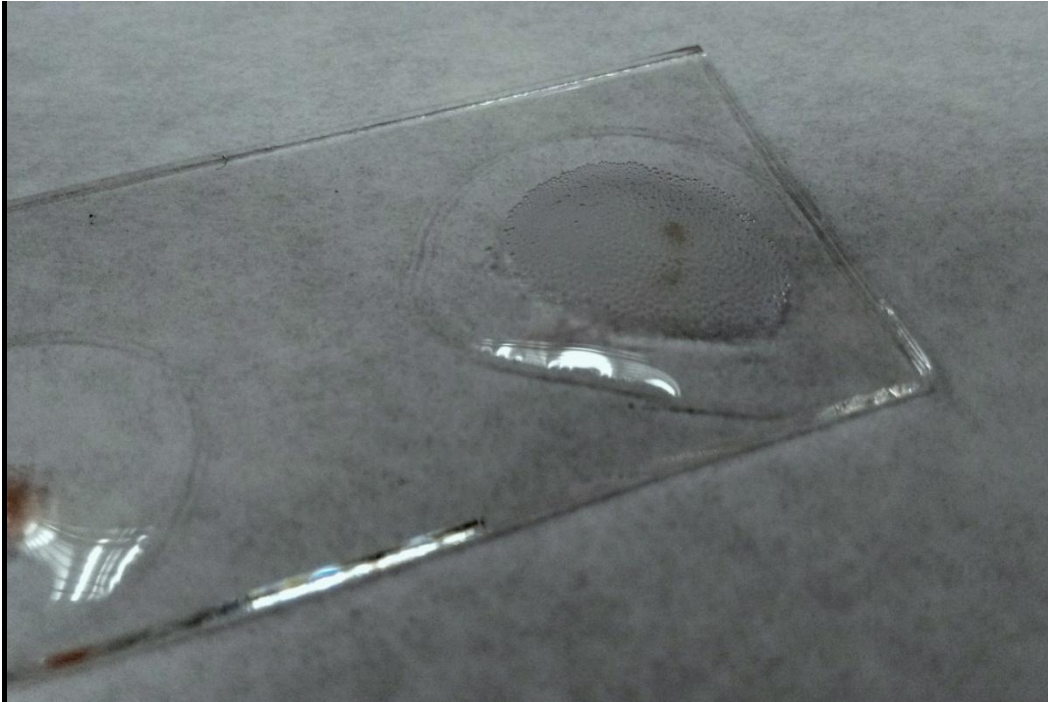


Imagen 12. Prueba de la catalasa positiva.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez sembradas las placas, incubadas a su temperatura correspondiente y pasadas 48h vamos a mostrar los resultados obtenidos en el trabajo.

5.1. Recuentos obtenidos en los distintos medios

- **Medio TSA**

El medio TSA es un medio general para el recuento de microorganismos totales de una muestra, en realidad no nos indica la calidad de la muestra pero si nos puede dar una idea de la cantidad de microorganismos que posee, aunque al poder crecer tanto bacterias gram positivas, negativas, hongos y levaduras no podremos decir a simple vista de que microorganismo se trata. (Forbes, 2009).

TSA					
	0	-1	-2	-3	UFC/ml
Muestra 1	15	24	0	0	$1,5 \times 10^2$
Muestra 2	227	27	2	1	$2,27 \times 10^3$
Muestra 3	260	80	0	0	8×10^3
Muestra 4	250	52	3	0	$5,2 \times 10^3$
Muestra 5	>300	>300	2	0	3×10^4
Muestra 6	>300	170	14	16	$1,7 \times 10^4$
Muestra 7	>300	>300	118	12	$1,18 \times 10^5$
Muestra 8	>300	>300	103	8	$1,03 \times 10^5$
Muestra 9	>300	22	0	0	$2,2 \times 10^3$
Muestra 10	>300	53	24	2	$5,3 \times 10^3$
Muestra 11	2	1	1	0	2×10^1
Muestra 12	>300	158	62	0	$1,58 \times 10^4$
Muestra 13	229	105	74	0	$1,05 \times 10^4$
Muestra 14	>300	236	70	60	$2,36 \times 10^4$
Muestra 15	>300	165	44	10	$1,65 \times 10^4$
Muestra 16	>300	100	57	0	1×10^4
Muestra 17	>300	0	0	0	$>3 \times 10^3$

Tabla 1. Recuento del medio TSA

En nuestro caso como se puede observar en la tabla 1 en todas las muestras ensayadas se detecta una cantidad de microorganismos del orden de 10^2 , 10^3 , 10^4 , o 10^5 , según la normativa el recuento de microorganismos totales sería preocupante por encima de 10^5 o 10^6 UFC, índice que deberíamos de tener en cuenta en las muestras de agua 7 y 8, donde se deberían de comparar los resultados con los recuentos obtenidos en los demás medios ensayados.

- **Medio VJ**

El medio VJ se utiliza para identificar *Staphylococcus* aunque en el medio también pueden crecer otra serie de microorganismos no patógenos.

VJ			
	0	-1	UFC/ml
Muestra 1	0	0	0
Muestra 2	>300	2	3×10^3
Muestra 3	0	2	0
Muestra 4	25	0	$2,5 \times 10^2$
Muestra 5	3	1	3×10^1
Muestra 6	64	3	$6,4 \times 10^2$
Muestra 7	>300	10	$>3 \times 10^3$
Muestra 8	>300	>300	$>3 \times 10^3$
Muestra 9	123	3	$1,23 \times 10^3$
Muestra 10	29	0	$2,9 \times 10^2$
Muestra 11	0	0	0
Muestra 12	0	0	0
Muestra 13	43	2	$4,3 \times 10^2$
Muestra 14	22	3	$2,2 \times 10^2$
Muestra 15	4	0	4×10^1
Muestra 16	0	0	0
Muestra 17	62	0	$6,2 \times 10^2$

Tabla 2. Recuento del medio VJ

Los recuentos obtenidos en este medio como se puede observar en la tabla 2, son muy bajos y en algunas de las aguas inexistentes, no es un indicador de

contaminación fecal, pero nos puede servir como complemento al resto de los ensayos de contaminación fecal. En los resultados del medio VJ, podemos ver como destacan las muestras 2, 7 ,8 y 9, con una mayor representación, de estas muestras la 2 y 9 son de agua no potable con lo cual no son aptas para el consumo, en cambio las muestras 7 y 8 vienen de fuentes que aunque no están controladas en cuestión de normativa por el ayuntamiento, son usadas por los excursionistas de forma esporádica para su consumo.

- **Medio MacConkey**

En el medio MacConkey, donde crecen microorganismos entéricos y se inhiben los no entéricos encontramos doce de las muestra con crecimiento bacteriano (Tabla 3).

MacConkey			
	0	-1	UFC/ml
Muestra 1	0	0	0
Muestra 2	7	15	7×10^1
Muestra 3	4	0	4×10^1
Muestra 4	8	0	8×10^1
Muestra 5	9	0	9×10^1
Muestra 6	24	4	$2,4 \times 10^2$
Muestra 7	89	0	$8,9 \times 10^2$
Muestra 8	>300	90	$3,0 \times 10^3$
Muestra 9	111	2	$1,11 \times 10^3$
Muestra 10	109	2	$1,09 \times 10^3$
Muestra 11	0	0	0
Muestra 12	0	0	0
Muestra 13	57	4	$5,7 \times 10^2$
Muestra 14	128	7	$1,28 \times 10^3$
Muestra 15	0	0	0
Muestra 16	0	0	0
Muestra 17	8	0	8×10^1

Tabla 3. Recuento del medio MacConkey

Este ensayo se utiliza como indicador de contaminación fecal, es un medio obligatorio en todos los controles de aguas que sirvan para el consumo humano. Y sería de gran interés en los países subdesarrollados y zonas rurales donde las aguas están menos controladas y la enfermedad que causa suele ser endémica, por todo ello su incidencia varía según los países y en éstos según las áreas geográficas. (García-Rodríguez, 1998).

En España la identificación de coliformes se realiza según la legislación del Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano y que se aplicarán a todas aquellas aguas que, independientemente de su origen y del tratamiento de potabilización que reciban, se utilicen en la industria alimentaria o se suministren a través de redes de distribución públicas o privadas, depósitos o cisternas. Se fijan parámetros y valores paramétricos a cumplir en el punto donde se pone el agua de consumo humano a disposición del consumidor. Estos valores se basan principalmente en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y en motivos de salud pública aplicándose, en algunos casos, el principio de precaución para asegurar un alto nivel de protección de la salud de la población y determinan que la presencia de *E.coli* en las muestras de agua debe ser de 0 UFC en 100 ml, aunque recalca que en algunos casos se puede aceptar hasta 100 UFC siempre acompañado de otros ensayos. Recuentos de más de 100 UFC indicarían que el agua no es apta para el consumo.

En nuestro caso como se observa en la tabla 3 se ven recuentos altos en las muestras de agua 6, 7, 8, 9, 10, 13, y 14. Como hemos indicado anteriormente las muestras 6, 7, 8 son fuentes improvisadas y utilizadas pero no controladas por sanidad, mientras que las otras cuatro muestras viene de aguas no potables, aunque al ser de pozo en algunas ocasiones se pueden utilizar para regar.

- **Medio MRS y KAA**

Con respecto a los recuentos en medio MRS y KAA para indicar la presencia de lactobacilos y enterococos en las muestras de aguas, los recuentos han sido prácticamente inexistentes (Tabla 4). En el caso de lactobacilos su presencia en el agua no sería representativa, mientras que la detección de enterococos si es un indicador de contaminación fecal de detección obligatoria por la normativa española.

Al igual que los coliformes la presencia de enterococos en la muestra debe ser 0 UFC aunque hasta 100 unidades pueden ser aceptadas comparando con otros parámetros. En nuestro caso tan solo la muestra 13 de pozo no apta para el consumo muestra un recuento de 3×10^2 UFC.

	MRS	KAA		
	0	0	UFC/ml(MRS)	UFC/ml(KAA)
Muestra 1	0	0	0	0
Muestra 2	0	0	0	0
Muestra 3	0	0	0	0
Muestra 4	0	0	0	0
Muestra 5	0	0	0	0
Muestra 6	0	0	0	0
Muestra 7	0	0	0	0
Muestra 8	0	0	0	0
Muestra 9	0	0	0	0
Muestra 10	0	2	0	0
Muestra 11	0	0	0	0
Muestra 12	0	0	0	0
Muestra 13	2	30	1	3×10^2
Muestra 14	0	0	0	0
Muestra 15	0	0	0	0
Muestra 16	0	0	0	0
Muestra 17	0	0	0	0

Tabla 4. Recuento de los medio MRS y KAA

5.2. Elección de colonias para identificación morfológica

Una vez obtenido el recuento de los diferentes medios decidimos elegir algunas de las colonias representativas de cada medio para poder realizar después un estudio morfológico de ellas. Se escogieron de las distintas muestras de agua y de los distintos medios siempre eligiendo la mayoría representada. En la tabla 5 se puede ver el aspecto de las colonias y el medio al que pertenecen en cada muestra.

Muestra/Medio	Aspecto
M 1/TSA	Amarilla redonda
M 11/TSA	Blancas
M 12/TSA	Amarilla redonda
M 16/TSA	Amarilla redonda
M 2/MacConkey	Rosa halo amarillo
M 3/MacConkey	Rosa halo amarillo
M 4/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 5/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 6/MacConkey	Amarillas
M 7/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 8/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 9/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 10/MacConkey	Amarillas/ Rosa con halo amarillo
M 13/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 14/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 17/MacConkey	Rosa con halo amarillo
M 3/VJ	Amarilla redonda
M 4/VJ	Amarilla redonda
M 5/VJ	Rosa
M 6/VJ	Amarilla redonda
M 7/VJ	Amarilla redonda
M 8/VJ	Amarilla redonda/Rosas
M 9/VJ	Rosas

M 10/VJ	Blanca redonda/Rosas
M 13/VJ	Rosas
M 14/VJ	Rosas
M 15/VJ	Rosas
M 17/VJ	Rosas
M 10/KAA	Negra con halo gris
M 13/KAA	Negra con halo gris
M 13/MRS	Blanca pequeña

Tabla 5. Muestras elegidas para identificación morfológica

5.3. Identificación morfológica de las colonias

- **Prueba de la catalasa y tinción de Gram**

A todas las colonias elegidas se les realizó la prueba de la catalasa tal y como se detalla en el apartado de material y métodos y la tinción de Gram. Los resultados se pueden observar en la tabla 6.

Como se puede ver en la mayoría de los casos se pudo observar que las colonias picadas del medio Mac Conkey la mayoría eran bacilos Gram – pudiendo ser catalasa positiva o negativa, pudiendo pertenecer al grupo de las enterobacterias. En el caso de las colonias picadas del medio VJ se observó que era cocos Gram positivos, catalasa +, lo que nos indica que pueden ser estafilococos. Las colonias picadas de los medios KAA se observaban como bacilos, lo cual nos indican que no eran los enterococos que queríamos detectar.

Muestra	Medio Cultivo	Catalasa	Gram
1	TSA	-	Bacilos Gram +
2	MC MRS	+ -	Bacilos Bacilos Gram - Gram +
3	MC VJ	+ +	Bacilos Cocos Gram - Gram +
4	MC VJ	+ +	Bacilos Cocos Gram - Gram +
5	MC VJ	+ +	Bacilos Cocos Gram - Gram +
6	MC VJ	- +	Bacilos Cocos Gram - Gram +
8	MC VJ	+ +	Bacilos Bacilos Gram - Gram +
9	MC VJ	+ +	Bacilos Cocobacilos Gram + Gram -
10	MC MC VJ KAA	- + + -	Bacilos Bacilos Cocos Bacilos Gram - Gram - Gram + Gram +
11	TSA	+	Cocos Gram +
12	TSA	-	Bacilos Gram +
13	MC VJ KAA MRS	+ + + -	Bacilos Bacilos Bacilos Bacilos Gram - Gram - Gram + Gram +
14	MC VJ	+ +	Cocobacilos Bacilos Gram - Gram -
15	TSA VJ	- +	Cocobacilo Bacilo Gram - Gram +
16	TSA	+	Cocos Gram +
17	MC VJ	+ +	Bacilos Bacilo Gram + Gram -

Tabla 6. Prueba de la catalasa y tinción de Gram.

5.4. Comparativa entre las diferentes muestras

Una vez obtenidos todos los resultados podemos comparar las distintas muestras de aguas ensayadas, como se observa en la siguiente tabla se puede decir que a simple vista las muestras 1, 3, 11, 12, 15,16, y 17, son muestras aptas para el consumo ya que carecen casi totalmente de la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal, en el caso de la muestra 17 los recuentos son muy bajos y si nos fijamos en la morfología en la tabla 6 no corresponde a indicador fecal. Todas estas muestras están cogidas de fuentes de consumo público controladas sanitariamente.

Muestra	UFC				
	TSA	VJ	MC	MRS	KAA
1	$1,5 \times 10^2$	0	0	0	0
2	$2,27 \times 10^3$	3×10^3	7×10^1	0	0
3	8×10^3	0	4×10^1	0	0
4	$5,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	8×10^1	0	0
5	3×10^4	3×10^1	9×10^1	0	0
6	$1,7 \times 10^4$	$6,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	0	0
7	$1,18 \times 10^5$	$>3 \times 10^3$	$8,9 \times 10^2$	0	0
8	$1,03 \times 10^5$	$>3 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0	0
9	$2,2 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$	$1,11 \times 10^3$	0	0
10	$5,3 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	$1,09 \times 10^3$	0	2
11	2×10^1	0	0	0	0
12	$1,58 \times 10^4$	0	0	0	0
13	$1,05 \times 10^4$	$4,3 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	1	3×10^2
14	$2,36 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$	$1,28 \times 10^3$	0	0
15	$1,65 \times 10^4$	4×10^1	0	0	0
16	1×10^4	0	0	0	0
17	$>3 \times 10^3$	$6,2 \times 10^2$	8×10^1	0	0

Tabla 7. Recuento de UFC.

Las muestras en las que hay mayor diversidad son la 2, 4, 5, 9, 13 y 14, son la mayoría sacadas de pozos que no se usan para consumo, aunque alguno de ellos si para regar, cosa que habría que tener en cuenta dado el alto recuento

de alguna de ellas en microorganismos fecales. La muestra 10 se cogió de la depuradora, con objeto de tenerla como control positivo de agua no apta para el consumo humano.

Las muestras 6, 7 y 8 muestran una cantidad de coliformes al límite, y como hemos comentado anteriormente proviene de lugares donde el hombre las utiliza esporádicamente para beber o bañarse, pero no están controladas por sanidad

Por los que vemos, y como debe ser, podríamos decir que los resultados son positivos, ya que en las diferentes fuentes donde el agua es apta para el consumo es fiable, en comparación con otras que no son aptas para su consumo.

En los siguientes gráficos 1 y 2 podemos ver también los datos obtenidos:

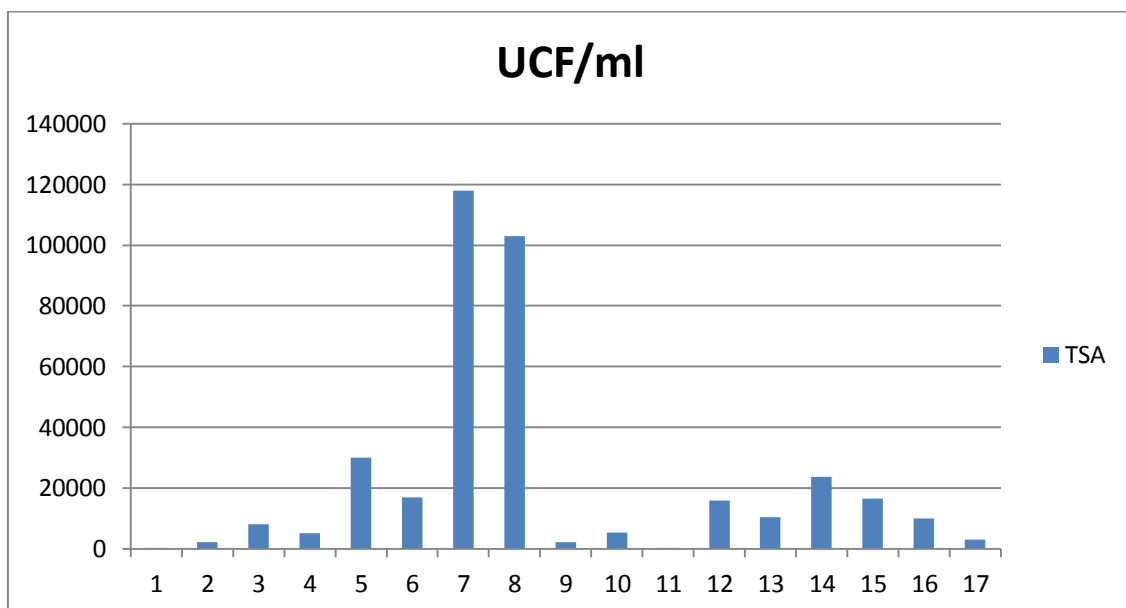


Gráfico 1. Representación de las UFC del medio del TSA.

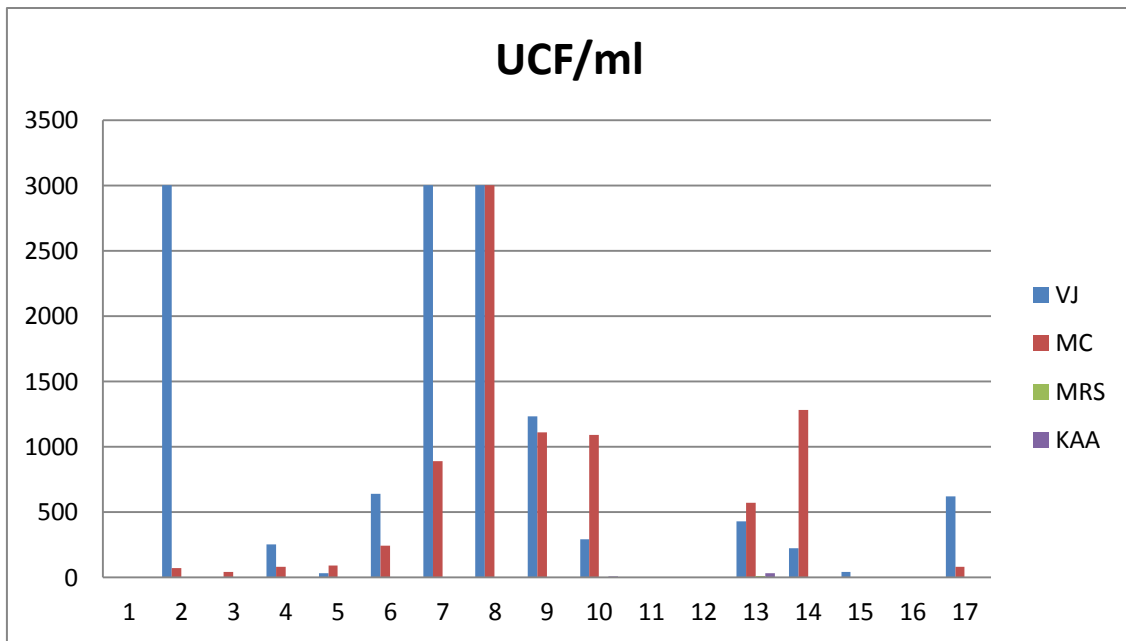


Gráfico 2. Representación de las UFC de los medios selectivos.

Con un mayor recuento en el medio TSA, el medio general que hemos utilizado para el estudio, el cual no tiene ninguna restricción para el crecimiento de los microorganismos. Y en los demás medios, medios selectivos, lo que vemos es que hay mucho menos crecimiento, e incluso no se ven en la gráfica por su valor tan pequeño. Destacando esos si más UFC en algunas muestras en el medio VJ y MC, mientras que en MRS y KAA en cambio, no se observa crecimiento.

6. CONCLUSIONES

El análisis microbiológico es una forma útil para detectar contaminaciones fecales del agua y así asegurar desde el ámbito sanitario la calidad de estas.

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

1. Se ha comprobado la presencia de distintos grupos bacterianos en alguna de las muestras de aguas
2. Se ha observado un cambio importante en los recuentos microbianos en las muestras aptas para el consumo y las que no lo son.
3. Los menores recuentos bacterianos se han detectado en las aguas aptas para el consumo
4. Los microorganismos aislados sobre los medios selectivos y el medio general han mostrado relación con los tipos bacterianos identificados mediante tinción de Gram y prueba de la catalasa.

7. BIBLIOGRAFÍA:

Ahmed, E.Y, Carolyn, C. 2006. Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza (España).

Anon. 1993. Council Directive on the Hygiene of Foodstuffs (93/43/EEC). Official Journal of the European Communities no. L 175, Brussels.

APHA, AWWA, WPCF. 1992. Métodos normalizados. Para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos 17ª, S.A.

Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health (CDC/NIH). 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th, Ed. U.S. Government Printing Office, Washington.

Codex Alimentarius commission. 1994. Food and agriculture organization of the United Nations, Roma.

Difco Laboratories. 1998. Difco manual. 11th, Ed. Difco Laboratories, Sparks, MD.

Dirección General de Salud Pública y Participación. 2005. Programa de vigilancia sanitaria y calidad del agua de consumo en Andalucía. Ed. Junta de Andalucía. Conserjería de Salud, Sevilla.

Forbes, B.A, Sahm, D.F, Weissfeld, A.S. 2009. Diagnostico Microbiológico. Editorial medica panamericana.

Galvín, M,R. 1996. Química, microbiología, tratamiento y control analítico de aguas. Servicio de Publicaciones Córdoba : Universidad de Córdoba.

Galvín, M.R. 2003. Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos, tratamiento y control de calidad de aguas. Ed. Díaz de Santos S.A. (Madrid).

Gamazo, C, López-Goñi, I, Díaz, R. 1995. Manual práctico de microbiología. 3ª edición, Ed. Masson.

García-Rodríguez, J.A, Picazo, J.J. 2008. Microbiología médica. Microbiología médica general. Editorial: Harcourt brace.

Harly, Klein, Prescott, 2004. Microbiología. 5ª edición, Ed. McGraw-Hill. Aravaca (Madrid).

ICMS. 2000. Microorganismos de los alimentos 6: Ecología microbiana de los productos alimentarios. Ed. Acribia, Zaragoza (España).

Inglis, T.T.J. 1991. Churchill guía de bolsillo de Microbiología clínica. Ed. Harcourt Brace de España.

Pascual, M^aR, Calderon, V. 2000. Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª edición, Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid (España)

Rheinheimer, G. 1987. Microbiología de las aguas. Ed. Acribia, S. A.

Roberts, T.A, Bryan F.L, Christian, B.H.J, Kilsby, D, Olson, J.C, Silliker, J.H. 1999. Microorganismos de los alimentos 2, métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. 2ª edición, Ed. Acribia, S.A.

Walter, J, Weber, J.R. 2003. Control de la calidad del agua. Procesos fisicoquímicos. Ed. Reverté, S. A.

- **Legislación consultada:**

Unión Europea. Directiva Marco de la Política del Agua. 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000.

España. Ley Orgánica 9/82.

España. Real Decreto 140/2003. BOE 45 del 21/02/2003.

España. Orden SCO 1591/2005 de 30 de mayo. BOE 131 del 2/06/2005.

España. Orden SAS 1915/2009 de 8 de julio.

España. Orden SSI, de 19 de febrero.

- **Páginas webs consultadas:**

http://www.who.int/water_sanitation_health/

[http://www.scharlab.com/catalogo-productos.](http://www.scharlab.com/catalogo-productos)

<http://pagina.iccm.es/agenciadelagua/>

<https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/>

[http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem)

<http://www.msssi.gob.es/ca/profesionales/saludPublica/>