



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico del agua en la provincia de Jaén

Alumno: Lorena Calvillo Villaverde

Julio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico del agua en la provincia de Jaén

Alumno: Lorena Calvillo Villaverde

Julio, 2014

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Agua	6
1.1.1. <i>Tipos de agua</i>	6
1.1.2. <i>Usos del agua</i>	7
1.2. Aguas de consumo	8
1.2.1. <i>Parámetros para el análisis bacteriológico</i>	11
1.2.2. <i>Características del agua potable</i>	11
1.2.3. <i>Deterioro de la calidad de agua de consumo.</i>	13
1.3. Agua y microorganismos	14
1.3.1. <i>Microorganismos indicadores de la calidad del agua</i>	14
1.3.2. <i>Enfermedades de transmisión hídrica</i>	16
1.3.3. <i>Control microbiológico del agua: indicadores fecales</i>	20
1.4. Higiene para la captación, elaboración y comercialización de aguas	21
1.5. Legislación de aguas a nivel nacional e internacional	22
1.5.1. <i>Legislación nacional</i>	22
1.5.2. <i>Normas internacionales</i>	23
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Materiales	
3.1.1. <i>Muestras de aguas utilizadas en el estudio</i>	24
3.1.2. <i>Medios de cultivo empleados</i>	
3.1.2.1. <i>Definición de medio de cultivo</i>	25
3.1.2.2. <i>Clasificación de los medios de cultivo</i>	26
3.1.2.3. <i>Medios de cultivo empleados en el estudio</i>	27
3.1.3. <i>Material de laboratorio utilizado</i>	33

3.2. Métodos de análisis microbiológico	
3.2.1. <i>Diluciones seriadas para el aislamiento de microorganismos a partir del crecimiento bacteriano</i>	34
3.2.2. <i>Recuento microbiológico en placas</i>	35
3.2.3. <i>Tinción diferencial de Gram</i>	36
3.2.4. <i>Prueba de la catalasa</i>	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados obtenidos del recuento microbiológico en placas	37
4.1.1. <i>Resultados medio MRS agar</i>	38
4.1.2. <i>Resultados medio MacConkey agar</i>	39
4.1.3. <i>Resultados medio Vogel-Johnson agar</i>	40
4.1.4. <i>Resultados medio KAA agar</i>	41
4.1.5. <i>Resultados medio TSA agar</i>	42
4.1.6. <i>Comparación de todas las muestras</i>	43
4.1.7. <i>Tabla comparativa de los diferentes medios de cultivo</i>	44
4.2. Resultados de la tinción de Gram y de la prueba de la catalasa	45
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFÍA	47
7. PÁGINAS WEB	50

RESUMEN

El agua es un elemento natural e indispensable para la vida y el acceso a agua potable debería ser un derecho universal. El agua apta para consumo debe tener una alta calidad en la que se encuentre libre de microorganismos patógenos, de minerales y sustancias orgánicas que puedan producir efectos fisiológicos adversos en la salud. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades relacionadas con agua potable contaminada son las responsables de las tres causas principales de muertes en el mundo incluyendo el 60% de mortalidad infantil en países en vías de desarrollo. Es por ello, que un adecuado control microbiológico del agua es muy importante para descartar posibles riesgos para la salud. En este estudio, se ha realizado un análisis microbiológico de aguas subterráneas procedentes de pozos localizados dentro del área de Jaén, y se ha demostrado que este tipo de agua tiene mejor calidad bacteriológica que otras aguas procedentes de fuentes superficiales, ya que se encuentra exenta de grandes cantidades de organismos patógenos causantes de enfermedades perjudiciales para la salud.

ABSTRACT

Water is a natural and essential for life and access to drinking water should be a universal right. The water suitable for consumption must have a high quality which is free of pathogenic microorganisms, minerals and organic substances that may produce adverse physiological effects on health. According to the World Health Organization, the contaminated drinking water-related diseases are responsible for the three leading causes of deaths in the world, including 60% of child mortality in developing countries. Therefore, an adequate microbiological control of water is very important to rule out possible health risks. In this study, we carried out a microbiological analysis of groundwater from wells located within the area of Jaen, and it has been shown that this type of water has better bacteriological quality than other water from surface sources, since it is free of large amounts of pathogens that cause diseases harmful to health.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Agua.

Sustancia compuesta por un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno, cuya fórmula química es H₂O. A temperatura ambiente es líquida, inodora, insípida e incolora. Se considera fundamental para la existencia de la vida, es por ello que es necesario cuidar este recurso, porque de ella depende cualquier ecosistema, su flora y su fauna. Es el componente que aparece con mayor abundancia en la superficie terrestre.

La cantidad y calidad del agua dulce existente en la tierra es limitada. Su conservación es importante para el suministro de agua de bebida, la producción de alimentos y el uso recreativo. La calidad del agua puede variar ante la presencia de microorganismos infecciosos, productos químicos o radiaciones.

1.1.1. Tipos de agua.

Podemos clasificar los diferentes tipos de aguas según distintos criterios:

- **Según sus propiedades para el consumo:**
 - No potables: aguas no aptas para el consumo humano
 - Potables: aguas aptas para el consumo humano. No contienen elementos dañinos para la salud, como son microorganismo o sustancias tóxicas.
- **Las aguas potables, las podemos clasificar:**
 - Agua mineral: se diferencia del agua potable normal en su mayor proporción de sales minerales y de otros componentes. Se obtiene de manantiales naturales y de agua subterránea. Las calidades químicas y físicas deben ser protegidas para no sufrir ningún tipo de contaminación. Se debe recoger en una serie de requisitos que aseguren la pureza microbiológica y la composición química.
 - Aguas envasadas: pueden contener minerales de forma natural o añadidos. Procede del subsuelo o de la superficie. No pueden ser tratadas o alteradas antes de su envasado y pueden sufrir tratamientos

antimicrobianos que modifiquen sus características físicas y químicas siempre que sean para mejorar su calidad.

- **Según la procedencia de las aguas:**

- Aguas superficiales: se encuentran sobre la superficie del suelo. Son originadas en ríos, lagos, pantanos y el mar. Para que sean aguas potables deben someterse a un tratamiento que elimine los elementos perjudiciales para la salud.
- Aguas subterráneas: provienen de manantiales del interior de la tierra o la que se obtiene de pozos. Muestran un grado de contaminación más pequeño que la del agua superficial, pero incluso así, debe haber un tratamiento antes del consumo humano. Es utilizada para el suministro de aguas potables.

- **Según la actividad humana:**

- Aguas negras: agua procedente del abastecimiento de una comunidad después de haber sido contaminada por diferentes usos.
- Aguas residuales: Fluidos residuales en un sistema de alcantarillado. Agua utilizada en el hogar, en una comunidad, una granja, o una industria que tiene materia orgánica disuelta o suspendida. (Gayoso, A., 2013).

1.1.2. Usos del agua.

Según la Conserjería del medio ambiente y ordenación del territorio de la Junta de Andalucía, el uso de agua se puede dividir en consuntivo y no consuntivo.

El uso consuntivo es aquella parte del agua utilizada que no se devuelve al medio hídrico después de su uso. Los principales usos consuntivos son el suministro urbano, el industrial, el regadío, el riego de campos de golf y la ganadería. (Conserjería de medio ambiente y ordenación del territorio, 2013).

Por otro lado, el uso no consuntivo es la parte del agua utilizada que se devuelve al medio hídrico sin alteración demasiado su calidad. El uso no consuntivo restringe y limita el suministro de los usos consuntivos ya que precisa estar disponible en el tiempo y en el espacio con la calidad apropiada. Los principales usos no consuntivos son la generación de energía

hidroeléctrica, transporte, pesca, actividades recreativas y permitir la vida silvestre de diversas especies tanto acuáticas como terrestres.

1.2. Agua de consumo.

Las aguas de consumo son aquellas que bien en su estado original o después de haber sufrido un tratamiento son utilizadas para beber, cocinar, en la industria alimentaria, en la higiene personal...

Pueden proceder de diferentes fuentes de abastecimiento como redes de distribución públicas o privadas, cisternas y depósitos públicos o privados.

El agua se considera apta para el consumo cuando no tienen ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia en una concentración que pueda suponer un riesgo para la salud. Debe cumplir con los requisitos especificados para los parámetros microbiológicos, químicos, indicadores de calidad y radiactivos establecidos por la OMS.

La legislación vigente sobre el agua de consumo humano más importante es el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, atendiendo a la Directiva Comunitaria 98/83/CE por la que se establecen “los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano” y se fijan los parámetros y valores paramétricos a cumplir por el agua, valores basados por recomendaciones de la OMS y en motivos de salud pública.

Los principales parámetros y valores paramétricos, como parámetros microbiológicos, parámetros químicos, parámetros indicadores y radioactividad a controlar en la calidad del agua apta para consumo suministradas a través de una red de distribución pública o privada vienen detallados en la siguiente tabla junto con los valores máximos aceptados para poder ser considerada agua de consumo. (BOE, 2013).

Parámetros microbiológicos	Valor máximo aceptado para el considerar el agua apta para consumo
Microorganismos patógenos parásitos y/o	Ausencia

Coliformes fecales	Ausencia /100 ml
<i>Streptococcus</i> D de Lancefold	Ausencia /100 ml
Esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductores	Ausencia /20 ml
<i>Streptococcus</i> fecales	Máximo 10/100 ml
Recuento de colonias aerobias	Ausencia/ml
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ausencia/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia /100 ml
<i>Salmonella</i>	Ausencia /100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia /100 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia /100 ml
Enterovirus	Ausencia /100 ml
Parámetros químicos	Valor máximo aceptado para el considerar el agua apta para consumo
Antimonio	5,0 µg/l
Arsénico	10 µg/l
Benceno	1,0 µg/l
Benzopireno	0,010 µg/l
Boro	1 mg/l
Bromato	10 µg/l
Cadmio	5 µg/l
Cianuro	50 µg/l
Cobre	2,0 mg/l
Cromo	50 µg/l
1,2- Dicloroetano	3,0 µg/l
Fluoruro	1,5 mg/l
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	0,10 µg/l
Mercurio	1,0 µg/l
Microcistina	1 µg/l
Níquel	20 µg/l
Nitrato	50 mg/l
Nitritos	0,5 mg/l
Plaguicidas	0,50 µg/l
Plaguicida individual	0,10 µg/l

Plomo	10 µg/l
Selenio	10 µg/l
Trihalometanos	100 µg/l
Tricloroeteno	10 µg/l
Acilamida	0,10 µg/l
Epilohidrina	0,10 µg/l
Cloruro de Vinilo	0,50 µg/l
Parámetros indicadores	Valor máximo aceptado para el considerar el agua apta para consumo
Bacterias coliformes	0 UFC en 100 ml
Recuento de colonias a 22°C	100 UFC en 1 ml
Aluminio	200 µg/l
Amonio	0,50 mg/l
Carbono	1,0 mg/l
Cloruro	250 mg/l
Turbidez	Máximo 5 unidades nefelométricas de turbidez (UNT)
Color	15 unidades de color (UC)
Olor	Exenta de olor
Sabor	Exenta de sabor
Conductividad	2500 IS/cm ⁻¹ a 20°C
pH	6,5 a 9,5
Amonio	0,50 mg/l
Cloro combinado residual	2 mg/l
Cloro libre residual	1 mg/l
Radioactividad	Valor máximo aceptado para el considerar el agua apta para consumo
Dosis indicativa total	0,10 mSv/año
Tritio	100 Bq/l
Actividad α total	0,1 Bq/l
Actividad β resto	1 Bq/l

Tabla 1. Principales parámetros a controlar en la calidad del agua potable.

1.2.1. Parámetros para el análisis bacteriológico.

La contaminación del agua apta para el consumo es el principal problema para la salud, ya que son fuente de la mayoría de las bacterias patógenas entéricas. Hay microorganismos indicadores de contaminación fecal que ayudan a establecer la seguridad y calidad microbiológica del agua y alimentos. Estos microorganismos son: coliformes, *enterococos* y *pseudomonas*.

En el recuento bacteriológico se deben tener en cuenta:

- Las bacterias aerobias no deben superar el número de 100/ml. Un aumento de éstas es un indicador de una deficiente desinfección del agua.
- Las bacterias coliformes tienen un límite máximo de 2 bacterias/ml. Cuando se supere ese número, se procede a identificar que variedad del grupo coliforme está presente. Lo importante es si están presentes las bacterias del género *Escherichia coli*, lo que estaría indicando contaminación fecal. Además se debe determinar si existe presencia de bacterias del grupo C.E.K. (*Citobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*). Estas bacterias son potencialmente patógenas y su origen puede ser otro además del fecal como restos de materia orgánica en descomposición, heces de animales, etc.
- Las *pseudomonas* se ubican dentro del grupo C.E.K. Tienen gran facilidad de desarrollo en cualquier material orgánico por lo que tienen un alto índice de peligrosidad. También poseen una escasa sensibilidad a los antibióticos comunes. Para considerar el agua potable, no debe contenerlas.

1.2.2. Características del agua potable.

El agua potable de consumo público son las utilizadas en su estado natural o después de un tratamiento adecuado, ya sean aguas destinadas directamente al consumo o aguas utilizadas en la industria alimentaria, de forma que pueda afectar a la salud de las personas que tomen el producto final.

El agua potable posee cualidades fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas que la hacen apta para el consumo humano. Podemos diferenciar distintos tipos de agua potables: aguas de distribución pública o agua procedente del grifo, aguas de captación individual o de origen en pozos y aguas envasadas.

El agua además de utilizarse para el consumo, es un componente esencial de la industria alimentaria y es utilizada para diferentes actividades:

- Manipulación y conservación de alimentos.
- Utilización de hielo con fines de conservación.
- Limpieza y esterilización de productos y material.
- Aguas utilizadas en acuicultura.

Las industrias que emplean estas aguas durante sus actividades, deben tener la responsabilidad de poseer una calidad bacteriológica adecuada.

Las aguas subterráneas están mejor protegidas contra infecciones que las aguas superficiales porque proceden de capas profundas donde las contaminaciones son más difíciles que se produzcan, y la filtración a través de las capas sedimentarias delimita el número de microorganismos.

En la flora del agua nos podemos encontrar diferentes tipos de gérmenes: gérmenes habituales del agua, de origen terrestre y de origen humano o animal.

Los gérmenes acuáticos son en la mayoría de los casos algas microscópicas y bacterias de los géneros: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Corynebacterium* y otros de menor interés.

Entre los gérmenes de origen terrestre cabe destacar las bacterias esporuladas y *Streptomyces*.

Los gérmenes de origen humano o animal son patógenos y enterobacterias de origen intestinal, como *Escherichia coli*, coliformes fecales, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus fecales*, *Vibrio cholerae*, etc.

El agua puede ser también transmisora de virus, como poliomielitis y hepatitis vírica. (Pascual Anderson, M.R., 2005.)

1.2.3. Deterioro de la calidad de agua de consumo.

A medida que aumenta la demanda de agua en la población, pueden aparecer problemas vinculados con su calidad, sobre todo los producidos por la contaminación. Esta contaminación produce un cambio en la composición física, química o biológica del agua debido a la entrada de sustancias o microorganismos peligrosos que implican un riesgo para la salud de las personas. El mayor problema que se presenta es el contagio de enfermedades infecciosas de transmisión hídrica.

Los problemas más frecuentes para la contaminación del agua de consumo son:

- Problemas en el tratamiento de potabilización del agua por inadecuada aplicación o dosificación de aditivos y sustancias utilizadas en esos procesos.
- Problemas en las redes de abastecimiento, cuando se realiza una inadecuada elección de los materiales, o por su estado de conservación. Además, un adecuado diseño de las redes, evita la contaminación de nuevo del agua de consumo.
- Problemas con las instalaciones interiores por una mala elección y conservación de las tuberías, malas prácticas de instalación y mantenimiento, provocando alteraciones dentro de los hogares, industrias, hoteles...
- Problemas con los depósitos privados y aparatos de potabilización doméstica que no son adecuados o no tienen un correcto mantenimiento.

Hay cuatro parámetros que recogen las sustancias y microorganismos que se deben controlar en el agua de consumo según la normativa actual:

- Parámetros microbiológicos: indican la contaminación biológica de las aguas, provocando riesgos para la salud en el caso de que se produzca contaminación.
- Parámetros químicos: la contaminación llega al medio acuático por las actividades industriales, agrarias, las aguas de tormenta y a través de los efluentes y vertidos de aguas residuales de origen urbano.

- Parámetros indicadores: su presencia está relacionada con la eficacia de tratamiento del agua y su control, con la percepción del agua a través de sus características organolépticas.
- Radiactividad: se debe a la radiactividad natural procedente del terreno, y está reflejada en determinados tipos de formaciones geológicas. Es más frecuente en las aguas subterráneas. (BOE, 2013).

1.3. Agua y microorganismos.

El agua es un recurso natural indispensable para la vida de los animales, incluido el hombre. Constituye una necesidad primordial para la salud, por lo que debe considerarse un derecho humano. Frecuentemente el agua actúa como vehículo de transmisión de microorganismos entéricos. El utilizar agua contaminada en la preparación de alimentos u otras actividades diarias produce numerosos casos de infección.

Todas las personas tienen derecho a disponer de un suministro satisfactorio, suficiente y accesible de agua inocua. Las personas que presentan mayor riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el agua son los lactantes y los niños de corta edad, las personas inmunodeprimidas, personas que viven en condiciones antihigiénicas, mujeres embarazadas y ancianos. La disminución de su calidad conlleva a la reducción a su número de usos, por lo que es necesario la realización de estudios que determinen la calidad del agua. Los análisis que se pueden realizar sobre el agua para controlar su calidad son físicos, químicos y microbiológicos. En esta ocasión se hará una determinación microbiológica.

1.3.1. Microorganismos indicadores de la calidad del agua.

Desde un punto de vista microbiológico, la garantía de una calidad de agua sin riesgos microbiológicos se basa en la aplicación, desde la cuenca de captación hasta el consumidor, de diferentes barreras para reducir la contaminación a niveles que no sean perjudiciales para la salud humana. La calidad del agua aumenta mediante el uso de barreras múltiples, como la protección de los recursos hídricos la aplicación de unas medidas correctas en el tratamiento y

evitar el vertido de residuos contaminantes en el agua o en lugares de almacenamiento de esta.

La presencia de microorganismos patógenos en el agua es un riesgo que se incrementa en las zonas marginales con mayor carga poblacional y que además no disponen de agua potable.

Los principales riesgos a nivel microbiológico para la salud derivados del consumo de agua contaminada se producen por excretas de humanos o animales. Estos pueden ser fuente de patógenos, como bacterias, virus, protozoos y helmintos. Los patógenos fecales son los que más importantes para la protección de la salud respecto a la inocuidad microbiana. Puede aumentar la concentración de patógenos desencadenando enfermedades que además pueden transmitirse a muchas personas antes de que se detecte el origen de la contaminación. Por ello, para asegurar la inocuidad microbiológica del agua no solo hay que realizar un análisis al producto final, sino que hay que realizar exámenes exhaustivos con frecuencia durante todo el proceso que sufre el agua desde la cuenca de captación.

Además de la contaminación por excrementos de humanos y animales que producen la mayoría de enfermedades de origen bacteriano, nos encontramos con otras formas de contaminación de agua. Una de ellas es la contaminación a través de los helmintos. El agua apta para consumo no debe contener larvas maduras ni huevos fertilizados, ya que uno sólo de ellos puede ocasionar una infección. Por otro lado, pueden aparecer enfermedades de origen vírico como la hepatitis A.

Algunos microorganismos forman biofilms sobre superficies que están en contacto con el agua. La mayoría de estos microorganismos no causan enfermedades en las personas sanas, pero pueden resultar molestos ya que generan sabores, olores o coloraciones del agua de consumo.

Todos los organismos presentes en el agua son importantes para establecer el análisis de control en calidad sin considerar si su medio natural es el acuático o si son poblaciones introducidas por el ser humano, y si tienen capacidad para provocar enfermedades. Se debe conocer la fisiología y morfología de los patógenos hídricos para poder determinar su presencia y origen, la cantidad y oscilación de su número, el curso de su ciclo vital y el índice de su supervivencia.

La OMS actualiza periódicamente sus normas para el consumo de agua con el fin de tomar en consideración el desarrollo de los conocimientos científicos y la importancia de la presencia de nuevos contaminantes.

1.3.2. *Enfermedades de transmisión hídrica.*

Las características del agua en relación al consumo y uso humano se hallan relacionadas, sobre todo con la cantidad de microorganismos acuáticos que ésta contiene. Algunos de ellos pueden dañar de forma más o menos grave la salud humana, dando lugar a diferentes patologías denominadas enfermedades de transmisión hídrica. Se producen de forma destacada en los países en vías de desarrollo, aunque en los desarrollados cada vez más habitual.

Las causas principales de enfermedad y muerte en el mundo están relacionadas con el consumo de agua contaminada y la disposición inadecuada de aguas excretas y residuos. Las aguas excretas son un gran riesgo para la salud pública por su elevada concentración en microorganismos patógenos y sustancias químicas.

Algunos microorganismos presentes en el agua pueden afectar de forma dañina al consumidor, tanto por sí mismo como produciendo toxinas durante su ciclo vital. Además, la virulencia que posea y la ocasionalidad temporal de cada enfermedad son propias y diferentes de cualquier otra.

Además el contenido microbiológico del agua afecta a las condiciones fisicoquímicas y da lugar a olores y sabores en el agua, incluso después de haber sido potabilizada. La potabilidad del agua debe llevarse hasta la ausencia total de microorganismos de todos los tipos, especialmente de microorganismos patógenos. Este es el objetivo de procesos industriales de desinfección.

En general los microorganismos patógenos se transmiten principalmente por ingestión de agua contaminada, aunque también se puede producir por contacto con personas o animales infectados, o por la exposición a aerosoles ricos en estos patógenos. Además dependiendo de la cantidad de los distintos patógenos se producirá una enfermedad más o menos grave en un individuo. Así por ejemplo, la ingestión de algunas bacterias de *Salmonella typhimurium*

son suficientes para contagiar el tifus, mientras millones de células de *Salmonella* se necesitan para dar lugar a un episodio de gastroenteritis.

Las enfermedades de origen hídrico las podemos clasificar en:

1. Enfermedades donde el agua está relacionada con el mecanismo de transmisión, donde se diferencian:
 - Enfermedades microbianas
 - Enfermedades tóxicas: producidas por aguas contaminadas con sustancias químicas.
2. Enfermedades donde el agua está relacionada indirectamente con la transmisión. Son producidas por vectores del hábitat acuático. (Acosta, R.S., 2008).

Las enfermedades hídricas más importantes son las relacionadas directamente con el mecanismo de transmisión, especialmente las enfermedades microbianas. Cabe destacar por su importancia las siguientes:

- a) Producidas por bacterias: *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*.
- b) Producidas por virus: aquellos relacionados con la Hepatitis y la Gastroenteritis.
- c) Producidas por protozoos: *Giardia lamblia*.
- d) Producidas por helmintos: dracunculosis.

CÓLERA:

Enfermedad caracterizada por diarrea acuosa y abundante. El agente contaminante que produce esta enfermedad es *Vibrio cholerae*. El contagio se produce por contacto directo con aguas contaminadas o alimentos contaminados por heces.

Las cepas de *V. cholerae* producen enterotoxinas proteicas denominadas toxinas coléricas. Las personas infectadas sufren una deshidratación que si no tiene un tratamiento rápido puede acabar en colapso circulatorio llegando a causar la muerte. Siete pandemias de cólera se recuerdan desde 1817. La mayoría de los casos que se dan actualmente tienen origen en África.

Vibrio cholerae es un bacilo Gram negativo, sin esporas y fermentador de glucosa, sacarosa y manitol. Tiene tamaño variable entre 1-3 µm de longitud y de 0,5-0,8 µm de diámetro. Pertenece a la familia *Vibrionaceae*, y posee

características similares con la familia *Enterobacteriaceae*. Tiene un flagelo polar único que le confiere un movimiento errático. (Ausina Ruiz, V., 2005.)

DIARREA DEL VIAJERO:

Es una enfermedad diarreica provocada por la infección con *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC). Se transmite a través de alimentos o agua contaminados con heces humanas o animales. ETEC es muy parecido a *Vibrio cholerae* ya que ambos dan lugar a una diarrea profusa y acuosa sin moco ni sangre.

ETEC es Gram negativo, anaeróbico facultativo, móvil por flagelos, no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.

La diarrea del viajero se da sobre todo en personas que viajan desde lugares con las normas de higiene adecuadas a otros lugares con condiciones pésimas de higiene o suministros de agua deficientes. Es frecuente que ocurra la diarrea en los países en vías de desarrollo entre niños, por tener una higiene precaria.

El principal reservorio de este microorganismo es el portador humano asintomático, persona recuperada de la infección que excreta al germen durante varios meses.

Los síntomas de esta enfermedad son el reflejo de la acción tóxica de la toxina que la produce. Suele aparecer de forma súbita con diarrea acuosa y dolor abdominal, aunque a veces puede aparecer de forma gradual. (Pascual Anderson, M.R., 2005).

FIEBRE TIFOIDEA O FIEBRE ENTÉRICA:

La fiebre tifoidea o fiebre entérica es causada por *Salmonella Typhi* cuyo único portador es el ser humano. Es una enfermedad infecciosa intestinal grave, que ha provocado un grave problema de salud pública en casi todo el mundo, aunque su incidencia ha disminuido en países con mejores niveles de higiene y saneamiento ambiental.

Las salmonellas son un género de bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móvil por flagelos y no desarrolla esporas. *S. typhimurium* es la única especie que desarrolla cápsula.

La transmisión a través de las aguas es lo más frecuente porque están altamente contaminadas con material fecal, o porque se utilizan para la

manipulación del alimento y los microorganismos tienen oportunidad de replicarse.

En los países subdesarrollados y zonas rurales donde las aguas están menos controladas la enfermedad suele ser endémica, por todo ello su incidencia varía según los países y en éstos según las áreas geográficas.

Las manifestaciones clínicas se presentan tras un período de incubación de 3 días a 3 semanas. Aparece un malestar general, fiebre alta, y aparición de manchas rosadas en tórax y abdomen. Las principales complicaciones aparecen como consecuencia de las metástasis intestinales, provocando hemorragia y perforación intestinal. (García-Rodríguez, J.A., 1998).

GIARDIASIS:

La giardiasis es una enfermedad provocada por la infección de la mucosa del duodeno y yeyuno proximal, cuyas manifestaciones clínicas son diarrea aguda o diarrea crónica. Es originada por *Giardia lamblia*, un protozoo flagelado que pertenece al orden *Diplomonadida* que parasita el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos. Presenta un tamaño inferior a 20 µm.

Su transmisión se produce por la ingesta de agua contaminada con quistes, ya sea por falta o tener inadecuados sistemas de purificación, por alimentos con quistes, de persona a persona y por excreción humana y de animales. Es decir, su transmisión es oro-fecal.

Las manifestaciones clínicas en la forma de asintomáticos solo se produce con excreción de quistes, sin ningún síntoma más grave. Cuando se produce una diarrea aguda se producen evacuaciones líquidas, con distensión abdominal, náusea y malestar general. En cuanto a la diarrea crónica se encuentra dolor abdominal, evacuaciones grasosas, anorexia, pérdida de peso y ataque al estado general (Herrerías, G., 1996).

HEPATITIS A:

El virus de la hepatitis A pertenece a la familia *Picornaviridae*. Es un virus pequeño, desnudo y de forma esférica que posee una cápside icosaédrica que protege un genoma con ARN positivo. La cápsida es resistente a los ácidos, a los detergentes y a las sales biliares. El virus mantiene la infectividad durante largos períodos de tiempo en pozos de aguas residuales y en el agua depurada inadecuadamente. El hombre es el hospedador natural de este virus.

Se adquiere por la ingesta de alimentos o de agua contaminados con materia fecal humana. La contaminación viral del agua o los alimentos y el contacto manual con utensilios o sanitarios contaminados es una fuente común de infección.

El período de incubación es de 4 semanas y es probable que el virus llegue a la circulación sanguínea a través de la bucofaringe o el revestimiento epitelial del intestino para alcanzar el hígado.

La hepatitis A es una enfermedad benigna y autolimitada que no deja secuelas y confiere inmunidad. Las manifestaciones clínicas se caracterizan con fiebre, cansancio, malestar general, anorexia, náuseas y vómitos. Puede ir seguido de ictericia, coluria e hipocolia. (Negroni, M., 2009).

DRACUNCULOSIS:

La dracunculosis es una enfermedad parasitaria que se transmite solo cuando personas con poco o ningún acceso a agua potable ingieren agua contaminada infectada por el parásito. Es conocida como enfermedad del gusano de Guinea, causada por *Dracunculus medinensis*, un largo gusano filiforme.

A partir del momento de la infección, comienza un ciclo de entre 10 y 14 meses al término del cual emerge del cuerpo un gusano maduro. Aparece una ampolla muy dolorosa, el 90% de las veces en la parte inferior de la pierna, y el gusano emerge por ella causando una intensa sensación de quemazón.

La gente ingiere las pulgas de agua infectadas al beber agua contaminada. Las pulgas son destruidas en el estómago, pero las larvas infectivas se liberan, atraviesan la pared intestinal y migran por el cuerpo.

El gusano hembra fecundado migra bajo los tejidos de la piel hasta llegar a las extremidades inferiores, donde forma una ampolla o tumefacción por la que finalmente sale al exterior. (OMS, 2014).

1.3.3. Control microbiológico del agua: indicadores fecales

La gran variedad de microorganismos del agua es tan numerosa que se hace prácticamente imposible diagnosticar la ausencia o presencia de flora microbiana en agua del consumo mediante análisis rutinarios y rápidos. Por ello se lleva a cabo la investigación de organismos que se encuentran presentes en las defecaciones humanas y de animales, que actúan así de organismos

indicadores de una contaminación fecal, confirmando así la eficacia de los procesos de potabilización y depuración del agua. La presencia de estos microorganismos indicará la probabilidad de la presencia de otros microorganismos patógenos.

El análisis microbiológico es una forma útil para detectar contaminaciones fecales del agua y así asegurar desde el ámbito sanitario la calidad. Para aguas de consumo abastecidas por redes en mal estado de conservación, la contaminación bacteriológica indica que hay una serie de defectos en la red antes de haberse realizado la potabilización del agua en la estación de tratamiento.

Aceptar que hay una serie de microorganismos indicadores de contaminación fecal no excluye la investigación de que haya otros microorganismos en el agua. Por eso cuando se producen situaciones epidémicas extremas, debe realizarse la detección de los microorganismos más habituales además de buscar otros nuevos. Esto supone el análisis de unos parámetros microbiológicos atípicos y poco frecuentes, pero conlleva directamente a las circunstancias de origen de dicha enfermedad.

Los exámenes rutinarios para la cuantificación total de microorganismos hídricos, especialmente los peligrosos para la salud, resultan complicados de realizar ya que hay una gran variedad de bacterias patógenas cultivables, a la que hay que añadir la complejidad de los ensayos de aislamientos y a la presencia en baja concentración de varias especies altamente agresivas. Por este motivo, los análisis bacteriológicos se dirigen a la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal y se centran en la cuantificación de coliformes. Este grupo está formado por enterobacterias, siendo *Escherichia coli* el indicador universal de contaminación fecal.

1.4. Higiene para la captación, elaboración y comercialización de aguas.

Hay ciertos criterios que hay que tener en cuenta durante la captación, la elaboración y la comercialización de aguas antes de consumirlas, ya que nos ayudarán a evitar la toma de agua contaminada.

La extracción del agua hay que realizarla en ciertas condiciones hidrogeológicas para evitar la captación de otras aguas que no sean inocuas. Además, el abastecimiento y distribución del agua se debe realizar lo más higiénicamente posible para no alterar las condiciones y que no supongan un peligro para la salud humana.

Se deben fijar diferentes medidas para la prevención de la contaminación o influencia externa de factores químicos, físicos y microbiológicos que modifiquen la composición del agua. Se deben tener en cuenta también los posibles agentes que causen olores, colores, sabores y turbidez en el agua, ya que sería un signo de contaminación y sería un agua no apta para el consumo humano.

Además hay que tener en cuenta la higiene del personal que trata con el agua destinada para beber, ya que deben de tener una serie de normas y reglamentos y tener formalizado un proceso de desinfección y limpieza de los utensilios de trabajo y el equipo en el almacenaje y transporte. Las instalaciones de almacenaje del agua deben estar formadas por materiales resistentes a la corrosión, ya que son fáciles de limpiar y evitar así cualquier tipo de contaminación que sea o no microbiológica.

1.5. Legislación de aguas a nivel nacional e internacional.

Debido al inadecuado uso y tratamiento de las aguas residuales urbanas, han tenido que realizar legislación a nivel nacional y normas internacionales para así evitar cualquier tipo de contaminación o inconveniente en relación al agua destinada al consumo humano. Para ello, voy a destacar las normativas más importantes que se han establecido.

1.5.1 Legislación nacional.

- **RD 1744/2003 de 19 de diciembre por el que se modifica el Real Decreto 1074/2002 de 18 de octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercia de aguas de bebida envasadas.**

El real Decreto 1074/2002, de 18 de octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas, establece los requisitos sanitarios exigibles a las aguas minerales naturales, de manantial, potables preparadas y de consumo público envasadas. Dicho real decreto supuso la incorporación parcial a nuestro organismo jurídico de la Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, así como la actualización de la normativa vigente hasta esa fecha sobre las aguas de bebida envasadas, constituida por el Real Decreto 1164/1991, de 22 de julio, modificado por el Real Decreto 781/1998, de 30 de abril, disposiciones que incorporaron a nuestro ordenamiento las Directivas 80/778/CEE, 80/777/CE y 96/70/CE.

- **Orden de 8 de mayo de 1987 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas.**
- **Resolución de 25 de enero de 1982 Libro Registro de análisis.**
- **Real Decreto 140/2003**

REAL DECRETO 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

La ley 14/1986 de 25 de abril, General de Sanidad, estableció la obligación de las Administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades.

La citada Ley prevé que las actividades y productos que, directa o indirectamente, puedan tener consecuencias negativas para la salud, sean sometidos por las Administraciones públicas a control por parte de éstas y a llevar a cabo actuaciones sanitarias para la mejora de los sistemas de abastecimiento de las aguas.

1.5.2. Normas internacionales.

- **CODEX Norma general para las aguas minerales naturales.**

Esta Norma se aplica a todas las aguas minerales naturales envasadas que se ofrecen a la venta como alimento. No se aplica a las aguas minerales naturales que se venden o utilizan para otros fines.

- **CAC/RCP 33-1985 Practicas de higiene para la captación, elaboración y comercialización de aguas minerales naturales.**

En el presente Código se recomiendan prácticas de higiene adecuadas para la captación de las aguas minerales naturales, su tratamiento, embotellado, envasado, almacenamiento, transporte, distribución y venta para el consumo directo, a fin de garantizar un producto inocuo, sano y saludable. Estas prácticas de higiene son particularmente importantes porque algunas de las medidas de control de la higiene que habitualmente se aplican a las aguas embotelladas, no pueden usarse para las aguas minerales naturales.

- **CODEX aguas envasadas distintas a las minerales naturales.**

La presente Norma se aplica a las aguas para beber distintas de las aguas minerales naturales según se definen en la Norma Revisada del Codex CODEX STAN 108-1981, que se envasan, se embotellan¹ y que son aptas para el consumo humano.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad microbiológica de diferentes aguas procedentes de distintas fuentes naturales de la comarca de Jaén.

Por otra parte, se quería determinar que muestras de agua eran aptas para el consumo tras un análisis bacteriológico mediante un proceso de recuento en placa.

Finalmente, se pretendía descartar posibles aguas contaminadas perjudiciales para la salud humana que originan diferentes tipos enfermedades.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Muestras de aguas utilizadas en el estudio.

Las fuentes de agua fueron seleccionadas al azar. Se recogieron muestras de agua en tubos falcom estériles. Se les preguntó a todos los individuos que proporcionaron las muestras voluntariamente cuáles eran los usos que se le daban a esa agua y todos contestaron que era para el abastecimiento propio del consumo de agua; excepto el agua procedente de la depuradora que fue utilizada como muestra control. Con las muestras de agua se realizó un análisis microbiológico para determinar la calidad del agua.

Las muestras de agua utilizadas en el ensayo fueron obtenidas de diferentes lugares dentro de la comarca de Jaén. Analizamos dieciséis tipos de aguas diferentes, cuya procedencia fue:

Muestra 1: Fuente Nueva, Lopera.

Muestra 2: Fuente Vieja, Lopera.

Muestra 3: Pozo para abastecimiento de un hogar en Linares.

Muestra 4: Fuente de los Manolillos, Peñolite.

Muestra 5: Fuente del Cañete, Peñolite.

Muestra 6: Fuente del Barranco Negro, Peñolite.

Muestra 7: Pozo para abastecimiento de un hogar en Fuensanta.

Muestra 8: Fuente del agua del papel, Valdepeñas de Jaén.

Muestra 9: Río frío, Carchelejo.

Muestra 10: Puente alto, Jaén.

Muestra 11: Fuente de las casas nuevas, Beas del Segura.

Muestra 12: Fuente de la Alameda, Jaén.

Muestra 13: Pozo para abastecimiento de un hogar en Martos.

Muestra 14: Depuradora de Jaén.

Muestra 15: Pozo para abastecimiento de un hogar en Alcaudete.

Muestra 16: Fuente del Pilar, Villargordo.

3.1.2. Medios de cultivo empleados.

3.1.2.1. Definición de medio de cultivo.

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos. Se deben tener unas condiciones adecuadas en el laboratorio para realizar un correcto cultivo sin ningún tipo de contaminación para no obtener resultados incorrectos. Se debe sembrar sobre

el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para poder realizar posteriormente un recuento de colonias.

Los medios de cultivo están formados por micronutrientes o elementos traza, macronutrientes y factores de crecimiento, los cuáles son necesarios para permitir en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo, éste debe reunir las condiciones específicas de temperatura, humedad, presión de oxígeno y un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

Los medios de cultivo, para poder ser utilizados y asegurar que los resultados que se obtengan a partir de ellos sean fiables, deben cumplir los siguientes requisitos: disponer de suficientes nutrientes, consistencia apta del medio, presencia o ausencia de oxígeno y otros gases, condiciones adecuadas de humedad, luz ambiental, pH adecuado, temperatura y esterilidad. (Madigan, M.T., 2004).

3.1.2.2. Clasificación de los medios de cultivo.

- **Según su origen:**

- Naturales: están preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal. No se conoce la composición química específica.
- Sintéticos: contienen una composición química definida cuali y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.
- Semisintéticos: son los sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento, como extracto de levadura.

- **Según su consistencia:**

- Líquidos: se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa.

- Sólidos: se preparan añadiendo un agar a un medio líquido. El agar es una sustancia inerte polisacárida que se extrae de las algas. Esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo. Se debe esterilizar para ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo.

- Semisólidos: contienen 7,5 g de agar/litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio.

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente con el agregado de agar.

- **Según su composición**: Según los requisitos químicos del mundo microbiano, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio.

- Comunes o universales: su propósito es el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos poco existentes. Es el medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas.

- Enriquecidos: formados por un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede añadir nutrientes como suplementos nutritivos. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.

- Selectivos: medios sólidos en los que se consigue especificidad alterando las condiciones o añadiendo o suprimiendo componentes químicos para evitar el crecimiento de especies que no nos interesan. Nos aseguramos así del crecimiento específico de la población que buscamos. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas.

- Diferenciales: son medios de cultivos que nos permiten distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. El enriquecimiento es una técnica que utiliza un medio selectivo líquido para permitir el desarrollo de un microorganismo a partir de una muestra que contiene una gran variedad de microorganismos.

- De transporte: son utilizados para asegurar la viabilidad de la bacteria sin multiplicación significativa de los microorganismos desde el momento de su extracción hasta su posterior estudio. Se utilizan generalmente cuando las muestras son trasladadas de un laboratorio a otro.

3.1.2.3. Medios de cultivo empleados en el estudio.

a. SOJA TRIPTONA (TSA) AGAR

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos. (Manuel Básico de Microbiología Cultimed, 2003).

- Fundamento

Por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes. Se utilizan como tales o como base para preparar medios especiales (Agar Sangre, Agar Proteus).

- Fórmula (por litro)

Digerido Papaínico de Soja5,0 g
Digerido Pancreático de Caseína15,0 g
Sodio Cloruro5,0 g
Agar15,0 g
pH final: 7,3±0,2

- Preparación

Suspender 40 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

- Modo de empleo

Tratar el medio según los fines a conseguir. Incubar el medio inoculado a 30-35°C de 18-24 horas hasta ≤ 3 días.

b. MacCONKEY AGAR

Medio de cultivo utilizado en la investigación de organismos coliformes.

- Fundamento

Por la presencia de las sales biliares y el cristal violeta se inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-positivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas, pudiendo presentar un halo turbio correspondiente al precipitado biliar.

Las bacterias lactosa-negativas dan colonias incoloras.

- Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

Lactosa	10,0
Peptona (carne y caseína)	3,0
Sales Biliares	1,5
Peptona de Gelatina	17,0
Rojo Neutro	0,03
Sodio Cloruro	5,0
Violeta Cristal	0,001
Agar	13,5

pH final: 7,1±0,2

- Preparación

Suspender 50 g en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45 °C y distribuir en placas de Petri estériles con 20 ml en cada una. Dejar solidificar las placas.

- Modo de empleo

Sembrar la muestra por estría en la superficie de la placa preenriquecida en MacConkey, Caldo. Incubar a 35-37 °C de 18 a 72 horas. La Farmacopea indica este medio para el control de *E. coli*. Incubación de las placas inoculadas a 30-35°C durante 18-72 horas. El crecimiento de colonias sobre el medio indica presunción de *E. coli*. Confirmar con tests identificativos.

c. MRS AGAR

Se emplea para el cultivo y recuento de Lactobacilos, tanto en productos lácteos como en productos alimenticios en general. Si se acidifica a pH=5,5 ±0,1 permite el recuento de los Lactobacilos propios del yogur.

- Fundamento

Por la presencia de la peptona, glucosa, manganeso y magnesio se aportan los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de los Lactobacilos. El di-Amonio Hidrógeno Citrato inhibe el crecimiento de la mayor parte de gérmenes contaminantes. El di-Potasio Hidrógeno Fosfato se emplea para estabilizar el pH del medio, mientras que el Tween® constituye su fuente de ácidos grasos. De esta manera este medio es ideal para el crecimiento masivo

de todas las cepas de Lactobacilos, incluso aquellas de crecimiento lento y difícil. El crecimiento también puede mejorarse reduciendo el pH hasta 5,5 aproximadamente, sin embargo, se dificulta la gelificación del medio.

- Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

di-Amonio Hidrógeno Citrato	2,0
Extracto de Carne	8,0
Extracto de Levadura	4,0
D(+)-Glucosa	20,0
Magnesio Sulfato	0,2
Manganeso(II) Sulfato	0,05
Peptona Bacteriológica	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sodio Acetato	5,0
Tween 80	1,0
Agar	10,0

pH: 6,2±0,2

- Preparación

Suspender 52 g en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición. Esterilizar a 121°C durante 12 minutos. Distribuir en placas de Petri estériles.

- Modo de empleo

El Caldo MRS permite realizar un enriquecimiento de la muestra o la determinación de microorganismos según NMP. Incubar en atmósfera al 5% de anhídrido carbónico a 35±2°C de 2 a 3 días o a 30°C durante 5 días. Los microorganismos obtenidos deberán ser identificados por otros métodos.

d. VOGEL-JOHNSON AGAR

El Agar Vogel-Johnson es un medio sólido altamente selectivo para el aislamiento y la identificación de Estafilococos manitol-positivos.

- Fundamento

La presencia del Litio Cloruro, de la Glicina y del Potasio Telurito dan a este medio una fuerte acción selectiva donde la flora secundaria es inhibida casi por

completo. Los Estafilococos reducen el telurito a telurio metal lo que da colonias negras sobre un fondo rojo si no son fermentadores del manitol. Los Estafilococos fermentadores del manitol, (presuntivamente patógenos), dan colonias negras rodeadas de un halo amarillo. El cambio de color del medio es debido al viraje del indicador de pH producido por la acumulación de productos ácidos, obtenidos en la fermentación del manitol. La selectividad del medio se mantiene durante las primeras 24 horas, pasado este tiempo pueden crecer otros microorganismos.

- Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

Extracto de Levadura	5,0
Glicina	10,0
Litio Cloruro	5,0
D(-)-Manita	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	5,0
Rojo de Fenol	0,025
Triptona	10,0
Agar	15,0

pH: 7,2±0,2

- Preparación

Suspender 60 g en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45-50°C y añadir 6 ml de Potasio Telurito al 3,5% estéril, por litro de medio. Mezclar bien y distribuir. Para un medio menos selectivo añadir sólo 3 ml de Potasio Telurito al 3,5%.

- Modo de empleo

Sembrar grandes inóculos en la superficie del medio. Incubar a 35±2°C de 24 a 48 horas. Los Estafilococos patógenos crecen casi siempre durante las primeras 24 horas. Las colonias de *Staphylococcus aureus* serán negras con halo amarillo. Una vez añadido el Potasio Telurito el medio no debe volver a fundirse, y su conservación no será más de 1 semana a 4°C.

e. KANAMICINA-ESCULINA-AZIDA (KAA) AGAR

Se emplea para la detección, aislamiento y confirmación de Enterococos en alimentos, aguas y otras muestras biológicas.

- Fundamento

La selectividad de estos medios para los Enterococos es muy elevada e incluso superior a la de otros medios comparables.

La canamicina sulfato y la azida sódica inhiben el crecimiento de la flora acompañante, mientras que los Enterococos pueden crecer sin restricción. A su vez estos microorganismos hidrolizan la esculina con la producción de glucosa y esculetina, la cual reacciona con el amonio hierro (III) citrato para dar un complejo de color variable entre el verde y el negro.

- Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

Tryptone:	20,0
Yeast extract:	5,0
Sodium chloride:	5,0
Disodium citrate:	1,0
Esculin:	1,0
Ferris-ammonium citrate:	0,5
Sodium azide:	0,15
Kanamycin sulfate:	0,02
Agar:	10,0

pH final: 7,0 ± 0,2

- Preparación

Suspender 48 g en 1 l de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y disolución total y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

- Modo de empleo

Se siembra 1 ml de la muestra o de las diluciones en el Caldo de cultivo, que se incubará a 35°C ± 2°C durante 48h. Se considerarán positivos aquellos tubos que hayan desarrollado un color verde negruzco. Estas placas se

incubaran a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas con lectura cada 24 horas. Los Enterococos forman colonias translúcidas rodeadas de un halo negro. Aislar las colonias y realizar las confirmaciones pertinentes.

f. SOLUCIÓN SALINA AL 85%

Cloruro sódico + Agua destilada (0.85 g/100 ml de H₂O destilada)

3.1.3. Material de laboratorio utilizado.

- Matraces estériles de diferentes tamaños.
- Alcohol de 96°.
- Encendedor de propano.
- Guantes.
- Placas de Petri estériles.
- Tubos de Ensayo.
- Gradillas.
- Pipetas de 1, 5, y 10 ml.
- Asas de siembra.
- Mechero Bunsen.
- Estufa de cultivo a 37° C.
- Baño de agua a 55° C.
- Tubos eppendorf.
- Puntas estériles para micropipetas.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Agua destilada.
- Lugol.
- Cristal violeta.
- Safranina.
- Peróxido de hidrógeno.
- Microscopio.

3.2. Métodos de análisis microbiológico.

3.2.1. Diluciones seriadas para el aislamiento de microorganismos a partir del crecimiento bacteriano.

Lo primero que se hizo fue preparar el material necesario para realizar el análisis microbiológico del agua. Preparamos tubos eppendorf y puntas para micropipetas que fueron autoclavados para su posterior uso.

Preparamos los medios de cultivo a partir de los botes que los contienen en estado granulado o en polvo. En los correspondientes botes pone la cantidad en gramos que debes añadir a un litro de agua para su preparación, pero en nuestro caso, no hicimos un litro, hicimos 1.600 ml de TSA, 1.200 ml de MacConkey, 1.200 ml de KAA Agar, 1.200 ml de Vogel-Johnson y 1.200 ml de MRS.

Para preparar los medios de cultivos lo primero fue calcular los gramos que debíamos pesar para añadirle al agua con una simple regla de tres. Una vez que mezclamos el agua y el material granulado o espolvoreado, mezclamos en un matraz y autoclavamos a una temperatura de 121 °C durante aproximadamente una hora y media. Posteriormente, atemperamos el medio de cultivo en un baño a 55°C, y lo extendimos en placas de Petri estériles. Para extenderlas basta simplemente con verter un poco del líquido, aproximadamente 10ml por placa agitar y dejar a temperatura ambiente hasta que solidifiquen para guardarlas en la cámara fría para su conservación.

Para preparar la solución salina añadimos la cantidad de gramos de cloruro sódico necesarios para la preparación de una disolución al 85% en 500 ml de agua destilada.

Una vez preparado el material necesario, pasamos a realizar una dilución en serie. La dilución en serie se realiza para conseguir diluir la solución madre y poder estudiar curvas de concentración y posteriores recuentos de células viables en placa.

Para realizarlas lo primero que se debe hacer es nombrar nuestros tubos eppendorf con distintas nomenclaturas para no equivocarnos. Cada muestra de agua será nombra con la letra A seguida del número de muestra, así por ejemplo el agua de Fuente Nueva de Lopera quedará como A1. A continuación debemos añadir el número de dilución que corresponda, en este caso sólo hemos realizado 3 diluciones, por lo que nuestros tubos eppendorf serán

llamados A1 1, A1 2 Y A1 3, según corresponda. Esto debe hacerse con todos los tubos eppendorf utilizados para las distintas aguas.

Utilizamos aproximadamente 30 tubos eppendorf con 900 μ l de solución salina cada uno. De la muestra de agua 1, nombrada como A1, tomaremos 100 μ l (solución madre) que añadiremos a nuestro primer tubo eppendorf con solución salina nombrado como A1 1; así obtenemos nuestra primera dilución 1:10. Se debe mezclar muy bien para poder utilizarla de nuevo. A continuación, de ese tubo eppendorf cogemos de nuevo 100 μ l que añadiremos al tubo nombrado como A1 2, obteniendo la dilución 10^{-2} . Y posteriormente, utilizar de nuevo 100 μ l del tubo A1 2 que añadiremos al tubo A1 3 dando lugar a la dilución 10^{-3} .

Todos los procesos que hagamos en microbiología deben realizarse en el mechero Bunsen para evitar la contaminación de las muestras. Además, todo el material debe estar esterilizado previamente.

Una vez obtenidas todas las diluciones de nuestras muestras, lo que se debe hacer es inocular las placas Petri con los diferentes medios. Para inocularlas debemos añadir 100 μ l en cada una de ellas y con un asa de siembra, previamente estéril, extender la muestra sobre su superficie. Una vez hecho este proceso con todas las placas, debemos dejarlas incubar en la estufa a 37°C durante 48 horas. Las placas se deben colocar con la base hacia arriba. Haremos un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 y 48 horas de su incubación que nos permitirá conocer el número de células viables existentes en el cultivo.

3.2.2. Recuento microbiológico en placas.

Pasadas 24 horas tras la incubación, se determina el número de células viables capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. Se considera que el número de colonias en una placa debe oscilar entre 30 y 300, con objeto de que la muestra sea estadísticamente representativa.

Para realizar el recuento microbiológico en placas se debe hacer un conteo de cada unidad formadora de colonia, que al sumarlas todas nos dará el número total de UFC en esa placa.

Esto debemos hacerlo con todas las placas de todos los medios de cultivos pasadas 24 y 48 horas de incubación.

3.2.3. *Tinción diferencial de Gram.*

La tinción de Gram es la técnica utilizada hoy en día en los laboratorios de bacteriología para el examen microscópico de las bacterias. Es tan importante, porque nos permite diferenciar por su estructura y grosor de la pared bacteriana, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Revela la forma de la bacteria, agrupación y grupo taxonómico al que pertenece. Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa pared de peptidoglicanos y no tienen membrana externa. Sin embargo, las bacterias Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicanos y sí poseen membrana externa, además poseen un alto contenido en lípidos.

Casi todas las bacterias que tienen importancia clínica pueden detectarse con este procedimiento, excepto los microorganismos que se hallan en exclusividad dentro de las células huésped.

El procedimiento de esta técnica consiste en extender y fijar la célula viable a la superficie del portaobjetos con una gota de agua destilada por calor. Se debe secar y dejar enfriar. Después el paso que se lleva a cabo es aplicar el colorante cristal violeta que se deja actuar durante dos minutos. Pasado este tiempo escurrimos el sobrenadante y añadimos Lugol, también durante dos minutos. Es un colorante yodado que nos permite que se una a la pared celular. Posteriormente quitamos el sobrenadante y procedemos a la decoloración o deshidratación con alcohol etílico durante 30 segundos; así conseguimos que los microorganismos Gram positivos retengan el cristal violeta y los Gram negativos lo pierdan. Lavamos el portaobjetos con agua destilada para quitar el exceso de alcohol. Añadimos safranina durante 2-3 minutos para teñir de color rosa o rojo las bacterias Gram negativas claras. Para finalizar esta técnica lavamos, secamos y pasamos a la observación en el microscópico con el objetivo de 100X con ayuda de aceite de inmersión.

Hay que tener en cuenta que una excesiva decoloración puede influir en que las bacterias Gram positivas se observen rosadas y no violetas. Además se debe prestar atención a los lavados que se deben realizar al ir añadiendo los diferentes reactivos de tinción, ya que si se deja un exceso de agua en la lámina los reactivos se diluirán y no producirán la tinción correctamente.

La tinción de Gram nos ayuda en la identificación de las bacterias que crecen en cultivos de manera que podemos diferenciar células por su morfología y disposición.

Nos podemos encontrar con cocos, teñidos de violeta y cuya disposición puede ser en racimos, cadenas, pares o tétradas. Además, nos podemos encontrar con bacilos en forma de cocobacilos, distribuidos al azar, o bacilos fusiformes. Por último, nos podemos encontrar con espiroquetas. (Forbes, B.A., 2009).

3.2.4. Prueba de la catalasa.

Muchos organismos pueden descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de las enzimas.

El H_2O_2 es tóxico para la mayoría de los organismos vivos. Muchos organismos son capaces de destruir el H_2O_2 mediante la acción de enzimas. El H_2O_2 se convierte en oxígeno y agua según la siguiente reacción: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. Esta técnica pone de manifiesto la presencia de catalasa en una bacteria. La catalasa es una enzima que descompone el agua oxigenada en oxígeno molecular que se desprende. La poseen la mayoría de las bacterias anaerobias.

Existen numerosos métodos para la demostración y cuantificación de la actividad catalasa en bacterias, pero la más frecuente por su simplicidad y exactitud es la que permite medir la producción de espuma formada por el desprendimiento de oxígeno molecular.

La prueba se efectúa a la temperatura a la que se encuentre el laboratorio. Debemos coger una célula viable de nuestra muestra y ponerla con el asa de siembra estéril en un portaobjetos. Añadimos una o varias gotas de agua oxigenada y observamos si se produce espuma o efervescencia. Si se produce estaremos ante una muestra catalasa positiva, si no se produce será negativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados obtenidos del recuento microbiológico en placas.

Una vez realizada la fase de incubación para las distintas muestras de agua analizadas, pasamos al recuento de células viables en las placas incubadas a

37°C en la estufa pasadas 24 horas. Además, volvimos a realizar un recuento 48 horas después para confirmar los resultados obtenidos u obtener un crecimiento posterior si no se había producido en las primeras 24 horas.

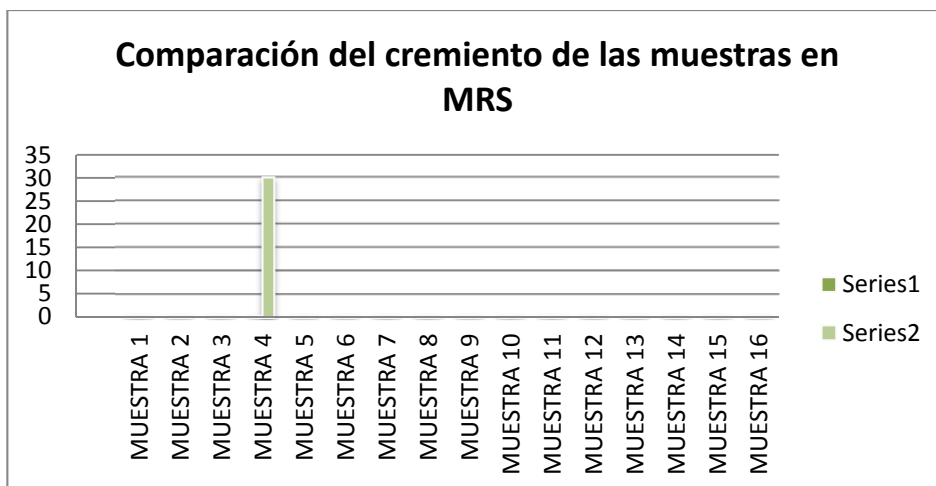
4.1.1. Resultados medio MRS agar.

MEDIO MRS		
MUESTRA	RECUENTO DE CÉLULAS TRAS 24 HORAS	RECUENTO DE CÉLULAS TRAS 48 HORAS
A1	0	0
A2	0	0
A3	0	0
A4	0	3×10^1
A5	0	0
A6	0	0
A7	0	0
A8	0	0
A9	0	0
A10	0	0
A11	0	0
A12	0	0
A13	0	0
A14	0	0
A15	0	0
A16	0	0

Tabla 2: Recuento en placa, medio MRS.

No se aprecia crecimiento significativo de bacterias lácticas en MRS. Solamente en la muestra 4, se obtuvo un breve crecimiento que dio lugar a un recuento de 10^1 de células viables transcurridas 48 horas de incubación.

Para poder comparar correctamente los datos de la tabla anterior, realizamos una gráfica donde se compare el número de células viables que han crecido transcurridas 24 y 48 horas. Como se puede observar, la muestra 4 es la única que tiene crecimiento tras pasar 48 horas de incubación.



Gráfica 1: Crecimiento en medio MRS de las diferentes muestras de agua.

4.1.2. Resultados medio MacConkey agar.

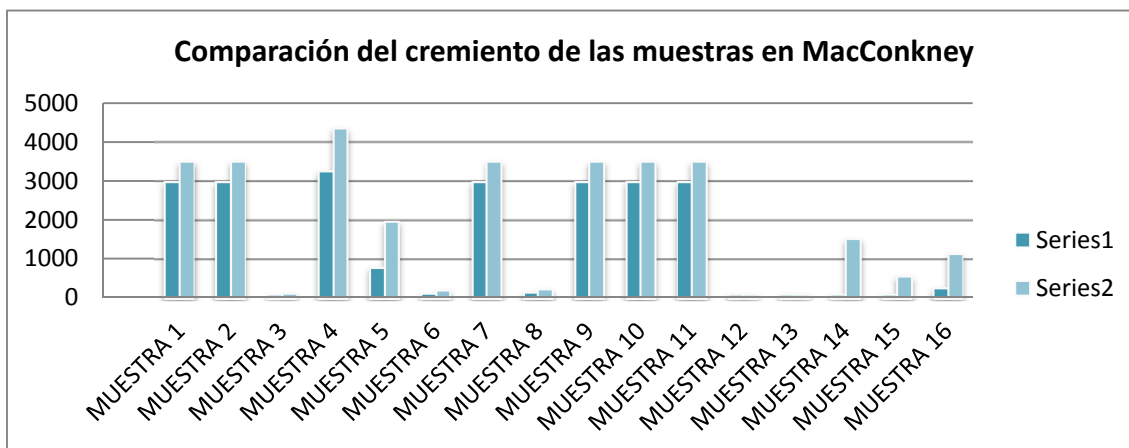
MEDIO MacCONKEY		
MUESTRA	RECuento DE CÉLULAS TRAS 24 HORAS	RECuento DE CÉLULAS TRAS 48 HORAS
A1 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A2 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A3 0	0	7×10^1
A4 0	$3,27 \times 10^3$	$4,35 \times 10^3$
A5 0	$7,9 \times 10^2$	$1,96 \times 10^3$
A6 0	7×10^1	$1,15 \times 10^2$
A7 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A8 0	8×10^1	$1,43 \times 10^2$
A9 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A10 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A11 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A12 0	0	0
A13 0	0	0
A14 0	0	$1,54 \times 10^3$
A15 0	$1,1 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$
A16 0	$2,8 \times 10^2$	$1,15 \times 10^3$

Tabla 3: Recuento en placa, medio MacConkey.

La mayoría de las muestras presentan un crecimiento bacteriano equitativo en Mc Conkey, ya que el recuento de células viables es muy similar. En la muestra

A3 el recuento significativo de células viables fue a las 48h; y en las muestras 12 y 13 no hay presencia de bacterias coliformes.

Para tener más claros los resultados de la tabla, se ha realizado un gráfico comparativo del crecimiento de las células pasadas 24 y 48 horas. Se puede observar que la muestra 4 es la que presenta mayor cantidad de bacterias coliformes, y por tanto, ese agua es el que presenta mayor contaminación.



Gráfica 2 Crecimiento en medio MacConkey de las diferentes muestras de agua.

4.1.3. Resultados medio Vogel-Johnson agar.

MEDIO VOGEL JOHNSON		
MUESTRA	RECUENTO DE CÉLULAS TRAS 24 HORAS	RECUENTO DE CÉLULAS TRAS 48 HORAS
A1 0	0	0
A2 0	0	0
A3 0	0	0
A4 0	0	0
A5 0	0	0
A6 0	0	0
A7 0	0	0
A8 0	0	0
A9 0	0	0
A10 0	0	0
A11 0	0	0

A12 0	0	0
A13 0	0	0
A14 0	0	0
A15 0	0	0
A16 0	0	0

Tabla 4: Recuento en placa, medio Vogel-Johnson.

No hay crecimiento bacteriano significativo en el medio Vogel-Johnson en ninguna de las muestras. Por lo tanto, podemos decir que no hay presencia de *Estafilococos*.

4.1.4. Resultados medio KAA agar.

MEDIO KAA AGAR		
MUESTRA	RECuento DE CÉLULAS TRAS 24 HORAS	RECuento DE CÉLULAS TRAS 48 HORAS
A1 0	0	0
A2 0	0	0
A3 0	0	0
A4 0	0	0
A5 0	0	0
A6 0	0	0
A7 0	0	0
A8 0	0	0
A9 0	0	0
A10 0	0	0
A11 0	0	0
A12 0	0	0
A13 0	0	0
A14 0	0	0
A15 0	0	0
A16 0	0	0

Tabla 5: Recuento en placa, medio KAA.

No hay presencia de crecimiento bacteriano significativo en KAA, excluyendo así la presencia de *Enterococos* en las muestras.

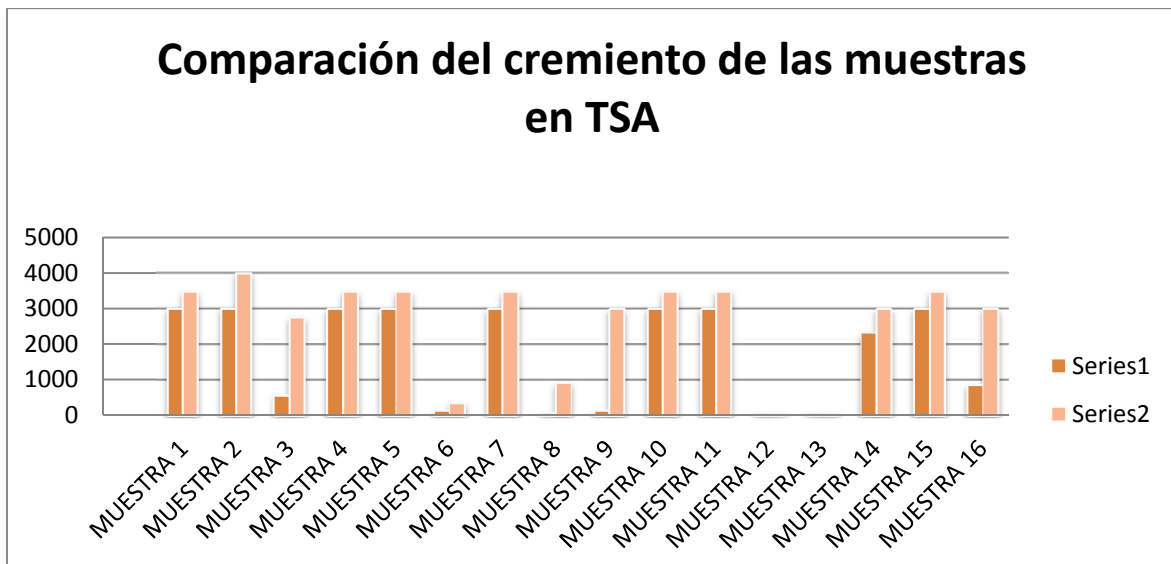
4.1.5. Resultados medio TSA agar.

MEDIO TSA		
MUESTRA	RECUENTO DE CÉLULAS TRAS 24 HORAS	RECUENTO DE CÉLULAS TRAS 48 HORAS
A1 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A2 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A3 0	$5,7 \times 10^2$	$2,76 \times 10^3$
A4 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A5 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A6 0	7×10^1	$3,6 \times 10^2$
A7 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A8 0	1×10^1	$9,3 \times 10^2$
A9 0	$1,6 \times 10^2$	$3,00 \times 10^3$
A10 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A11 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A12 0	0	0
A13 0	0	0
A14 0	$2,33 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A15 0	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
A16 0	$8,7 \times 10^2$	$3,00 \times 10^3$

Tabla 6: Recuento en placa, medio TSA.

En las muestras aparece un recuento de células viables entorno a 10^2 y 10^3 desde las primeras 24h de incubación. En las muestras de agua A12, A13 no se observó crecimiento de células viables en los recuentos en placas de TSA.

En la siguiente gráfica, podemos ver más claro la comparación del crecimiento de las bacterias transcurridas 24 y 48 horas. Se observa que el agua que presenta mayor crecimiento bacteriano es el agua 2, pero la mayoría de ellas han crecido notablemente pasadas 48 horas, excepto las muestras 6, 8, 12 y 13.

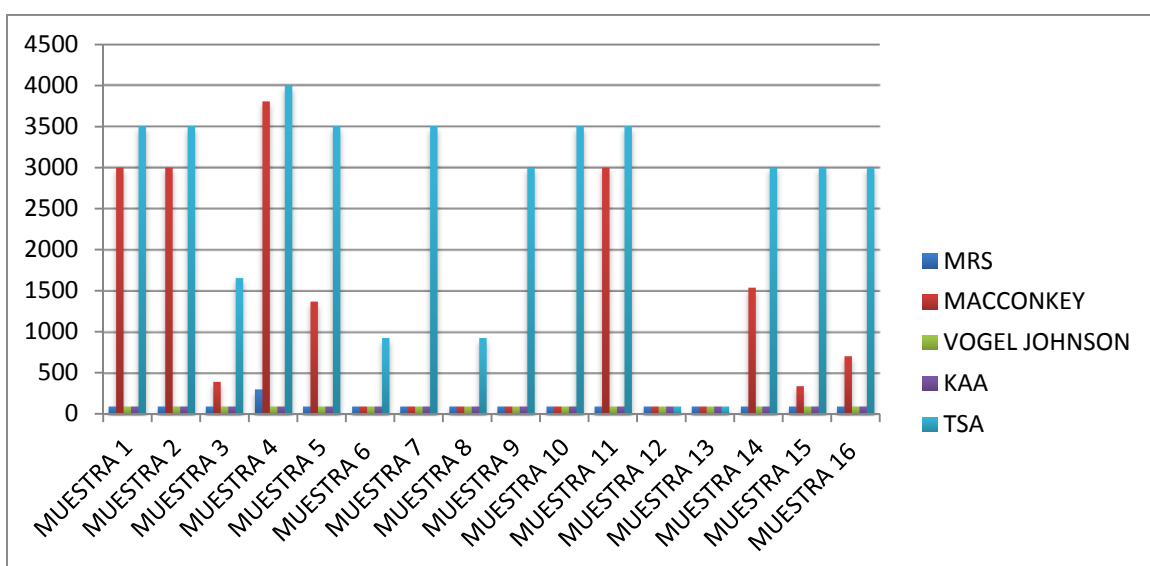


Gráfica 3: Crecimiento en medio TSA de las diferentes muestras de agua.

4.1.6. Comparación de todas las muestras.

Si realizamos una comparación de las 16 muestras de agua analizadas en todos los medios de cultivo, podemos observar que la muestra que presenta mayor carga microbiana es la muestra 4. Pero las muestras 1, 2 y 11 también presentan grandes cantidades.

Las muestras 12 y 13 son las que menos carga microbiana presentan, ya que han sido las únicas que no han tenido un crecimiento microbiano significativo.



Gráfica 4: Gráfica comparativa con el crecimiento de las muestras de aguas en los diferentes medios de cultivo.

4.1.7. Tabla comparativa de los diferentes medios de cultivo.

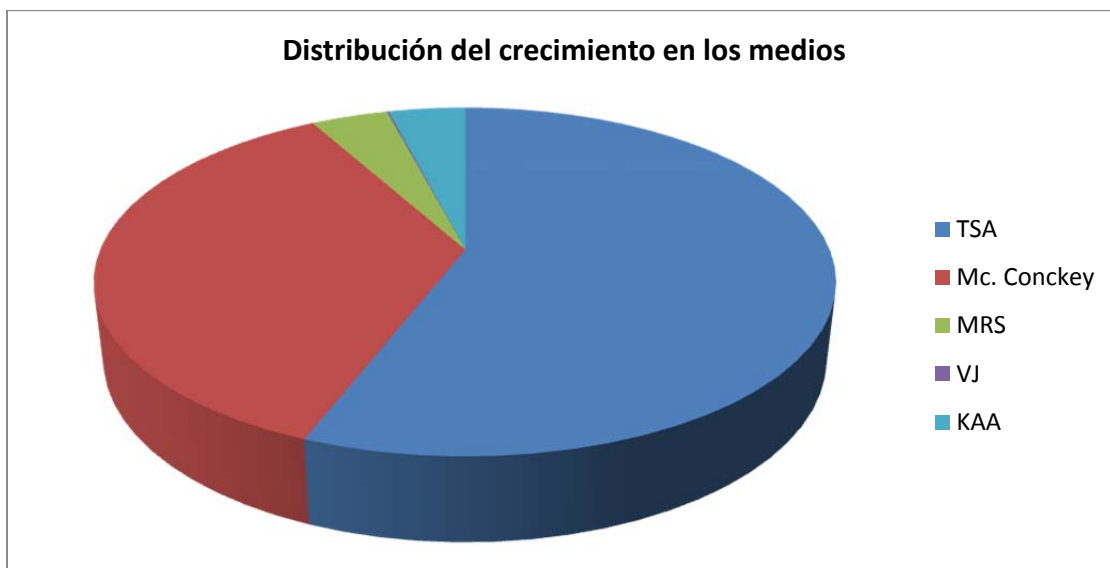
Tras haber realizado el estudio sobre el recuento de células viables en 16 muestras de agua, hemos obtenido unos valores muy diferentes de unos medios de cultivo a otros. En la siguiente tabla podemos ver los valores del recuento obtenidos tras 48 horas de incubación.

Medios de cultivo	Nº aguas crecidas/nº aguas ensayadas	% muestras	% Total
Mc. Conkey	9/16	56.25%	36%
VJ	0/16	0%	0%
KAA	1/16	6.25%	4%
MRS	1/16	6.25%	4%
TSA	14/16	87.5%	56%

Tabla 7: Valores del recuento en placas tras 48 horas de incubación.

Se puede observar que el medio más eficaz para realizar el recuento es el medio TSA, ya que es donde mayor cantidad de crecimiento de células viables se ha producido. El medio MacConkey también ha sido muy eficaz ya que representa un 36% del total del crecimiento. El medio que no nos ha proporcionado ningún valor ha sido Vogel-Johnson.

Visualmente, lo podemos representar diferenciando el crecimiento total de células viables de todas las muestras respecto al medio de cultivo específico.



Gráfica 5: Distribución del crecimiento de células viables respecto a los diferentes medios de cultivo.

4.2. Resultados de la tinción de Gram y de la prueba de la catalasa.

En la siguiente tabla se dan los resultados de la tinción de Gram y la enzima catalasa.

La mayoría de las muestras son bacilos Gram negativos, catalasa positivos.

Además en la muestra que presenta mayor carga microbiana, el agua 4, aparecen células viables que producen colonias blancas, cuyo análisis microbiológico indica que en su mayoría presenta Gram positivos y catalasa negativos.

Las muestras 3 y 9 presentan bacilos Gram negativos y son catalasa negativos.

MUESTRA	ASPECTO DE LA COLONIA	GRAM + / -	CATALASA + / -
A4/MRS	Blancas pequeñas	COCOS GRAM +	CATALASA –
A1/Mc Conckey	Rojas pequeñas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A1/ Mc Conckey	Naranjas pequeñas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A2/Mc Conckey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A2/Mc Conckey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A3/Mc Conckey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA -
A4/Mc Conckey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A4/Mc Conckey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +

A5/Mc Conkey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A5/Mc Conkey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A3/ TSA	Grandes amarillas	BACILOS GRAM -	CATALASA -
A6/Mc Conkey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A6/Mc Conkey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA -
A7/Mc Conkey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A7/Mc Conkey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A8/Mc Conkey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A8/Mc Conkey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A9/Mc Conkey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A9/Mc Conkey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA -
A10/Mc Conkey	Colonias naranjas	BACILOS GRAM -	CATALASA +
A10/Mc Conkey	Colonias rojas	BACILOS GRAM -	CATALASA +

Tabla 8: Resultados de la prueba diferencial de Gram y prueba de la catalasa.

5.CONCLUSIONES

- En el análisis realizado a 16 muestras de agua obtenidas de diferentes lugares dentro de la comarca de Jaén, se observó que tras realizar la tinción de Gram y prueba de la Catalasa a partir de las colonias obtenidas en los distintos medios de cultivo utilizados se apreció que la mayor carga microbiana se correspondía con morfología bacilar Gram – y Catalasa +, lo que indica la posible presencia de coliformes en dichas aguas.
- Tras la utilización de diferentes medios de cultivo para realizar la siembra en placa y los posteriores recuentos se pudo observar que el medio que más información aportó al respecto en cuanto al recuento de células viables fue el TSA, donde los datos indican valores entorno a 10^2 y 10^3 desde las primeras 24h de incubación.
- Si realizamos una comparación de las 16 muestras de agua analizadas en todos los medios de cultivo utilizados, podemos observar que la muestra que presenta una mayor cantidad de microorganismos es la número 4, siendo la 12 y 13 las que menor carga microbiana presentan.

5. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, R.S., 2008. Saneamiento ambiental e higiene de los alimentos. Editorial Brujas.

Ausina Ruiz, V. and Moreno Guillén, S. 2005. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana.

Farquhar, D. and Ellis, A.C. 2013. Journal of Environmental Health: 2013 environmental health legislation.

Fewtrell, L., Kaufmann, R.B., Kay, D., Enanoria, W., Haller, L. and Colford, J.M. Jr. 2005. The Lancet Infectious Diseases: Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis.

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

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

Gayoso, A., Iorumé, A. and Rojas, Y. 2013. Universidad Austral de Chile. Catastro y localización de usos públicos no extractivos o usos in situ del agua.

Gibbs, S.G., Meckes, M.C., Ortiz, M., Green, C.F. and Scarpino, P.V. 2008. Journal of Environmental Engineering and Science: Evaluation of the inhibition of culturable *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, or *Aeromonas hydrophilia* by an existing drinking water biofilm.

Herrerías Gutiérrez, J.M., Díaz Belmont, A. and Jiménez Sáenz, M. 1996. Universidad de Sevilla. Tratado de Hepatología.

Holman, E.J. and Brown, J. 2014. *Journal of Water and Health: Safety of packaged water distribution limited by household recontamination in rural Cambodia.*

Ivanova, L.V., Artemova, T.Z., Gipp, E.K., Zagaïnova, A.V., Maksimkina, T.N., Krasniak, A.V., Korneïchuk, S.S. and Shustova, S.S. 2013. *Gig Sanit: Harmonization of microbiological and parasitological indices of epidemic safety of drinking water with the international requirements.*

Krolik, J., Evans, G., Belanger, P., Maier, A., Hall, G., Joyce, A., Guimont, S., Pelot, A., Majury, A. 2014. *Journal of Water and Health: Microbial source tracking and spatial analysis of E. coli contaminated private well waters in southeastern Ontario.*

Lan, J.C., Yang, P.H., Ren, K., Chen, X.B., Xu, X. and Hu, N. 2014. *Huan Jing Ke Xue: Investigation of nitrogen, phosphorus and microbial contamination in Laolongdong underground river system of Chongqing.*

Lévesque, B., Pereg, D., Watkinson, E., Maguire, J.S., Bissonnette, L., Gingras, S., Rouja, P., Bergeron, M.G. and Dewailly, E. 2008. *Canadian Journal of Microbiology. Assessment of microbiological quality of drinking water from household tanks in Bermuda.*

Liu, S., Che, H., Smith, K. and Chen, L. 2014. *Environmental Science: Processes & Impacts. Contamination event detection using multiple types of conventional water quality sensors in source water.*

Locas, A., Barthe, C., Margolin, A.B. and Payment, P. 2008. *Canadian Journal of Microbiology. Groundwater microbiological quality in Canadian drinking water municipal wells.*

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Gacto Fernández, M., Rodríguez Fernández, C. and Sánchez Pérez, M. 2004. *Brock biología de los microorganismos. Editorial: Prentice Hall.*

Manuel Básico de Microbiología Cultimed, 2003, Editorial: Panreac Química S.A.

Negróni, M. 2009. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Editorial médica panamericana.

Ndounla, J. and Pulgarin, C. 2014. Science of the Total Environment: Evaluation of the efficiency of the photo Fenton disinfection of natural drinking water source during the rainy season in the Sahelian region.

Pascual Anderson, M.R., 2005. Enfermedades de origen alimentario. Su prevención. Editorial: Díaz de Santos.

Payment, P., Trudel, M., Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., Subrahmanyam, T.P., Gregory, B.E., Vajdic, A.H., Blaskovic, P., Guglielmi, I.J. and Kudrewko, O. 1984. Canadian Journal of Microbiology. Virological examination of drinking water: a Canadian collaborative study.

Pourfallah, F., Javadian, S., Zamani, Z., Siadat, S.D., Sh-Khatami and Saghiri, R. 2014. Pakistan Journal of Biological Sciences: Physico-chemical analysis of drinking groundwater of around Tehran by seasonal variation.

Robertson, B.K., Harden, C., Selvaraju, S.B., Pradhan, S. and Yadav, J.S. 2014. The Open Microbiology Journal: Molecular Detection, Quantification, and Toxigenicity Profiling of *Aeromonas* spp. in Source- and Drinking-Water.

Tian, J., Lu, J., Zhang, Y., Li, J.C., Sun, L.C. and Hu, Z.L. 2014. International Journal of Environmental Research and Public Health: Microbial Community Structures and Dynamics in the O3/BAC Drinking Water Treatment Process.

Tomperi, J., Juuso, E., Eteläniemi, M. and Leiviskä, K. 2014. Journal of Water and Health: Drinking water quality monitoring using trend analysis.

Tsega, N., Sahile, S., Kibret, M. and Abera, B. 2013. African Health Sciences: Bacteriological and physico-chemical quality of drinking water sources in a rural community of Ethiopia.

Voutchkova, D.D., Ernstsén, V., Hansen, B., Sorensen, B.L., Zhang, C. and Kristiansen, S.M. 2014. Science of the Total Environment. Assessment of spatial variation in drinking water iodine and its implications for dietary intake: A new conceptual model for Denmark.

Zamberlan da Silva, M.E., Santana, R.G., Guilhermetti, M., Filho, I.C., Endo, E.H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V. and Dias Filho, B.P. 2008. International Journal of Hygiene and Environmental Health: Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water.

Zhang, C., Liu, W.J., Zhang, M.L., Tian, F., Yang, Y. and An, DZ. 2012. Huan Jing Ke Xue: Review on characteristics and detecting assay of bacterial endotoxin contamination in water environment.

6. PÁGINAS WEB

<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.220de8226575045b25f09a105510e1ca/?vgnnextoid=9869a89971bb6310VgnVCM200000624e50aRCRD>

<http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>

http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/rd_140_2003.pdf

<http://www.boe.es/boe/dias/2003/12/30/pdfs/A46524-46529.pdf>

https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1987-11623

<https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-3596>

www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXS_108s.pdf