Control microbiológico de arenas

Mª José Benítez
Dpto. Microbiología

Clara Rovira
Servicios Marinos y del Litoral

Bilbao, 5 de noviembre de 2014

¿Quiénes somos?

AQUALOGY
Where Water Lives

Portfolio de más de 100 soluciones adaptables

Más de 10.000 profesionales

Actividad en más de **20 países**

Adaptación a las necesidades del cliente

Gestionamos más de 2,000 instalaciones

14 millones de euros en inversión I+D+i

Conocimiento acumulado en 150 años

¿Dónde estamos?

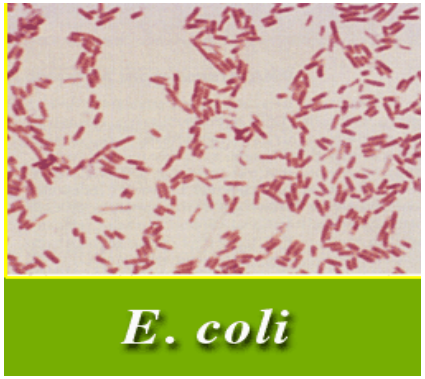
Nuestros servicios en ámbito costero

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ARENAS PLATAFORMAS Y DUCHAS DE PLAYAS

Puntos de muestreo

Tamaño de muestra a analizar

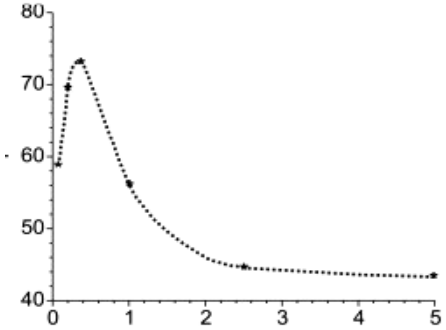
Definición de parámetros analíticos



Métodos de análisis

FALTA DE NORMALIZACIÓN

Definición de niveles críticos



TAMAÑO DE LAS MUESTRAS DE ARENA PARA SU ANÁLISIS

- Fase previa de extracción de los posibles microorganismos con un diluyente líquido.

Tamaño de la muestra relacionado con la proporción entre la cantidad de arena y volumen de diluyente.

Disparidad de criterios en la proporción y en la expresión de resultados

Peso de arena (g)	Vol. diluyente (mL)	Proporción	Expresión resultados (1)	Autores
100	900	1:10	N/g	Kevan *et al.* 2012
20	980	1:50	N/g	Shah *et al*. 2011
25	175	1:8	N/100g	Byappanahalli *et al.* 2006
200	1800	1:10	N/100g	Zanoli Sato *et al*. 2005
100	100	1:2	N/100g	Olańczuk-Neyman *et al.* 2001
10	90	1:10	N/100g	Elmanama *et al*. 2005
5	45	1:10	N/100g	Skórczewski *et al.* 2012
1	9	1:10	N/g	Ministerio Medio Ambiente. 2000
100	400	1:5	N/g	Labaqua. 2013

N: relacionado con la metodología aplicada : NMP (Número más probable) o UFC (Unidades formadoras de colonia)

PREAPARACIÓN DE MUESTRAS DE ARENA PARA SU ANÁLISIS

Preparación Mezcla

Peso de la arena y el diluyente en proporción 1:5 en cantidad suficiente para realizar todos los parámetros del análisis partiendo de una única muestra preparada

I

Homogenización y extracción de la mezcla

Agitación de la mezcla en Stomacher durante 5 min.

II

Decantación

Sedimentación de la arena, recogida del sobrenadante en un envase estéril.
Muestra preparada para el análisis

III

LABAQUA

DEFINICIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS

MICROORGANISMOS DE INTERÉS SANITARIO	ANALITOS
ARENA	
-BACTERIAS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL -BACTERIAS PATÓGENAS -VIRUS -HONGOS -HUEVOS DE NEMATODOS PARÁSITOS	-*Escherichia coli* -Enterococos -Mohos y levaduras
PLATAFORMA DUCHA	
-BACTERIAS PATÓGENAS -HONGOS DERMATOFITOS	-*Staphylococcus aureus* - Hongos Dermatofitos
AGUA DUCHA	
-BACTERIAS	-*Legionella pneumophila* - Agua de abastecimiento municipal que debe cumplir valores paramétricos del R.D. 140/2003 de agua de consumo

ARENA
RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES Y *E. coli*

Metodología empleada:
Técnica del sustrato definido (Colilert)

Método normalizado disponible comercialmente, que no precisa filtración ni confirmación de colonias.
Emplea dos indicadores específicos que caracterizan el metabolismo de los Coliformes y de *E. coli*:

La enzima β–Galactosidasa es característica de los Coliformes y la β–Glucuronidasa de E. coli. En presencia de un sustrato apropiado, viran dando una coloración amarilla en el caso de los coliformes y una fluorescencia azul en el caso de *E. coli*

ARENA
RECUENTO DE ENTEROCOCOS FECALES

Metodología empleada:
Técnica del sustrato definido (Colilert)

Método normalizado disponible comercialmente, que no precisa filtración ni confirmación de colonias.
Emplea un indicador específico que caracterizan el metabolismo de los Enterococos:

Un sustrato fluorogénico (MUG) es utilizado para detectar la enzima b –glucosidasa, que hidroliza el sustrato, produciendo una fluorescencia azulada cuando se expone a la luz ultravioleta de onda larga (365 nm).

ARENA
Recuento de mohos y levaduras.

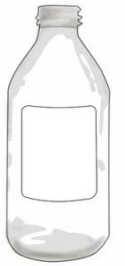
Recuento de mohos y levaduras. METODOLOGÍA

- Filtración a través de membrana de ésteres de celulosa de 100 mL de solución obtenidos de la extracción a partir del material sólido y de diluciones seriadas de la misma en base 10 utilizando como diluyente agua de peptona.

- Incubación del filtro sobre medio de cultivo Agar Rosa de Bengala con Cloranfenicol para inhibir la flora bacteriana.

- Tras periodo de incubación de 7 días a 22±2ºC recuento de las colonias siguiendo norma UNE-EN ISO 8199. Calidad del agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo.

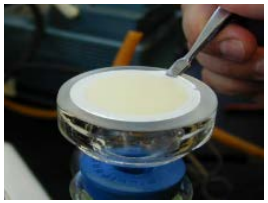
AGUA DE DUCHA
NORMA ISO 11731.Calidad del agua. Detección y recuento de *Legionella.* Parte 2:



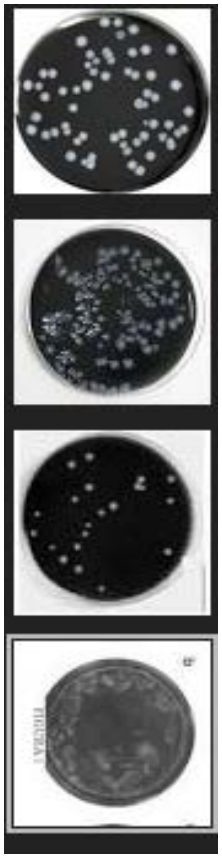
1 Litro de muestra

Destinado a muestras con escasa flora acompañante

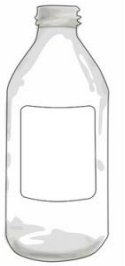
Filtración a través de membrana de esteres de celulosa con poro 0.45 µm



Tratamiento ácido directo sobre la membrana durante 5´
Siembra de la membrana sobre medio selectivo GVPC
Incubación a 37ºC durante 10 días
Aislamiento de colonias presuntivas
Confirmación de colonias:
- Ausencia de crecimiento en medio sin L-Cisteína
- Serogrupado por Aglutinación en Látex



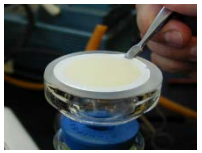
AGUA DE DUCHA
NORMA ISO 11731.Calidad del agua. Detección y recuento de *Legionella.* Parte 1:



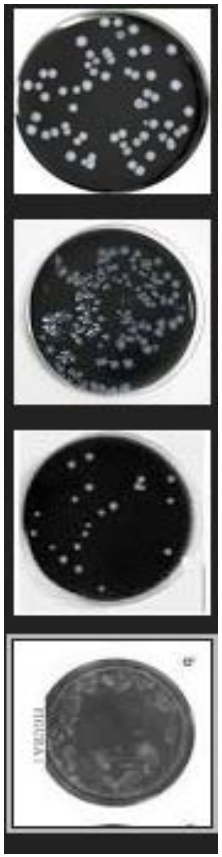
1 Litro de muestra

Destinado a muestras con presencia de flora acompañante

Filtración a través de membrana de policarbonato con poro 0.45 µm

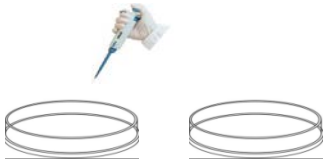


Elución de bacterias del filtro mediante vórtex



AGUA DE DUCHA
NORMA ISO 11731.Calidad del agua. Detección y recuento de *Legionella.*

Sin tratamiento



200 µL 50 µL

Tratamiento térmico (50ºC / 30')

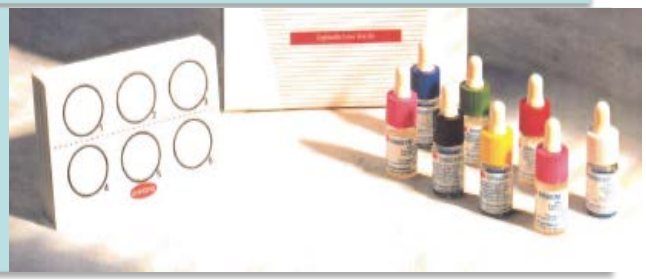
200 µL 50 µL

Tratamiento ácido (5')

200 µL 50 µL

Siembra en medio selectivo BCYE-GVPC e Incubación en atmósfera del 5% de CO_2 a 37± 1ºC, durante 10 días

<u>Confirmación</u>
1.- Ausencia de crecimiento en medio sin L-cisteína
2.- Serogrupado por aglutinación en látex



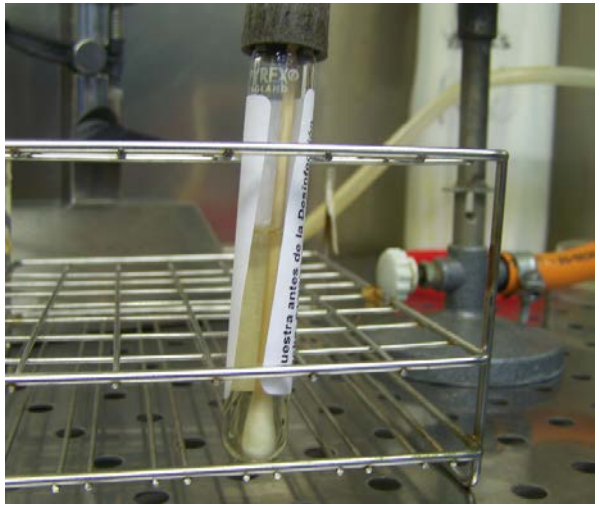
PLATAFORMAS DE DUCHA
Identificación de hongos dermatofitos

Identificación de hongos Dermatofitos. METODOLOGÍA

• Filtración a través de membrana de ésteres de celulosa de un volumen de agua de peptona que ha permanecido en contacto con el escobillón procedente de la toma de muestra de superficie de plataformas de duchas, y de diluciones seriadas de la misma.

• Incubación del filtro sobre medio de cultivo Sabouraud dextrosa o Agar DTM con Rojo Fenol como indicador.

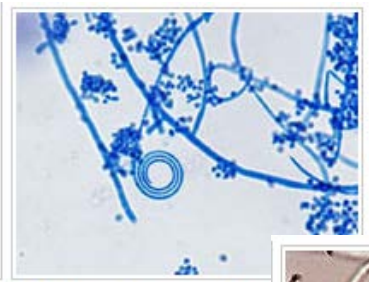
•Temperatura de incubación de 22±2ºC y tiempo de incubación de 21 días



PLATAFORMAS DE DUCHA
Identificación de hongos dermatofitos

IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA

Basadas en la textura, en la topografía, coloración del micelio, coloración del reverso, presencia del pigmento difusible o no difusible y periferia (lisa o con vellosidades)



T. rubrum (1,2)

IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

Observación microscópica tras tinción con azul de lactofenol.

La identificación se basa en la morfología de los conidios.

DEFINICIÓN DE NIVELES CRÍTICOS

Criterio. Entidad o autor	Parámetro	Concentración	Calidad
Legislación brasileña CONAMA 274/2000	Coliformes fecales	>1x10^5 ufc/g	Categoría inapropiada
	Candida sp.	>1x10^3 ufc/g	Categoría inapropiada

Criterio. Entidad o autor	Parámetro	Concentración	Calidad
Estándar portugués	Coliformes totales	100 ufc/g	VMA(1)
		5 ufc/g	VMR(2)
	E. coli	20 ufc/g	VMA
		1 ufc/g	VMR
	Enterococos	20 ufc/g	VMA
		1 ufc/g	VMR
	Levaduras	60 ufc/g	VMA
		3 ufc/g	VMR
	Hongos	85 ufc/g	VMA
		5 ufc/g	VMR
	Dermatofitos	15 ufc/g	VMA
		0 ufc/g	VMR

VMA: Valor Máximo Admisible

VMR: Valor Máximo Recomendable

DEFINICIÓN DE NIVELES CRÍTICOS

Criterio. Entidad o autor	Parámetro	Concentración	Calidad
Benidorm. Concejalía de Medio Ambiente y playas: Estudio estadístico local para establecer valores guía	Coliformes totales	10 ufc/g	Valor guía
		130 ufc/g	Valor imperativo
	Hongos totales	249 ufc/g	Valor guía
		820 ufc/g	Valor imperativo
	Hongos dermatofitos	44,50 ufc/g	Valor guía
		180 ufc/g	Valor imperativo

Criterio. Entidad o autor	Parámetro	Concentración	Calidad
Ajuntament Barcelona AMB Diputació Barcelona DIPSALUT	*E. coli*	<100 NMP/100g	Óptima
		100-10000 NMP/100g	Buena
		>10000 NMP/100g	Deficiente
	Enterococos	<100 NMP/100g	Óptima
		100-10000 NMP/100g	Buena
		>10000 NMP/100g	Deficiente

Criterio. Entidad o autor	Parámetro	Concentración	Calidad
Instituto Pasteur	Gérmenes patógenos	1 N/g*	Valor guía
		10 N/g	Valor imperativo
	E. coli	10^2 N/g	Valor guía
		10^4 N/g	Valor imperativo
	Enterococos	10^2 N/g	Valor guía
		10^4 N/g	Valor imperativo
	Mohos y levaduras	10^3 N/g	Valor guía
		10^5 N/g	Valor imperativo

DEFINICIÓN DE NIVELES CRÍTICOS

Criterio	Jornada	Calidad	Base
Ministerios de Medio Ambiente y de Fomento	"Indice de Calidad de las Playas " (Madrid 2000)	Mala	Categorías en función de un "índice de contaminación acumulada", relacionada con la media aritmética de los resultados de los parámetros microbiológicos y físico químicos de todas las muestras de arena analizadas en una playa concreta durante la totalidad de la jornada de baño.
		Tolerable	
		Buena	
		Excelente	

Datos de un estudio realizado por el Ayuntamiento de Barcelona. Periodo de junio 1979 a octubre 1981. Análisis de 461 muestras de arena

INDICE DE CONTAMINACIÓN ACUMULADA PARA ARENAS				
PARAMETRO	VALOR ASIGNADO PARA CADA INTERVALO DE CONCENTRACION			
	3	2	1	0
Coliformes fecales	Ausencia	1-15	16-30	>30
Estreptococos fecales	Ausencia	1-15	16-30	>30
Hongos	<100	101-1000	1001-10000	>10000
Candida albicans	Ausencia	1-50	51-100	>100
Mercurio	0-0,1	0,1-0,2	0,2-0,3	>0,3
Cadmio	0-0,1	0,1-0,2	0,2-0,5	>0,5
Plomo	0-15	16-30	31-60	>60
Cobre	0-12	13-25	26-50	>50
Zinc	0-62	63-125	126-250	>250
Carbono Orgánico	0-5	6-25	26-100	>100

Salubridad de las playas. Resultados

Salubridad de las playas. Resultados

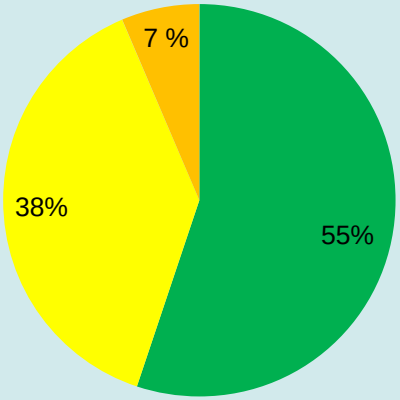
Arena playa

544 muestras
81 playas (2014)

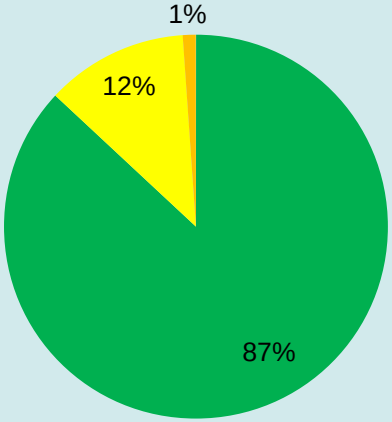
69% muestras con Enterococos
23% muestras con Escherichia coli

80% playas con resultados > 100 NMP/100 mg

Enterococos



E. coli



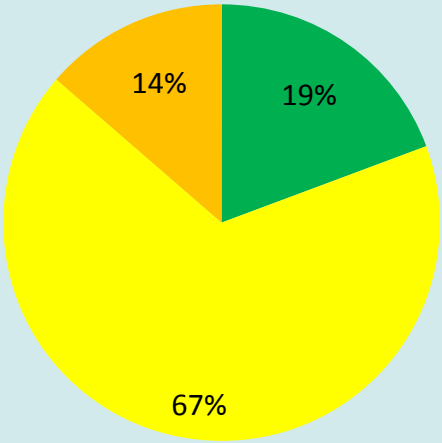
Óptima	< 100 NMP/100 g
Buena	100-10.000 NMP/100 g
Deficiente	> 10.000 NMP/100 g

Arena perimetral duchas

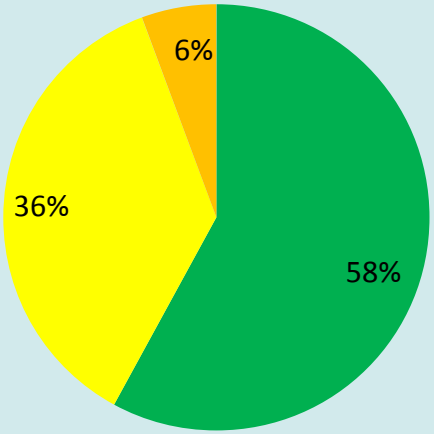
176 muestras
80 playas (2014)

95% muestras con Enterococos
63% muestras con Escherichia coli

Enterococos



E. coli

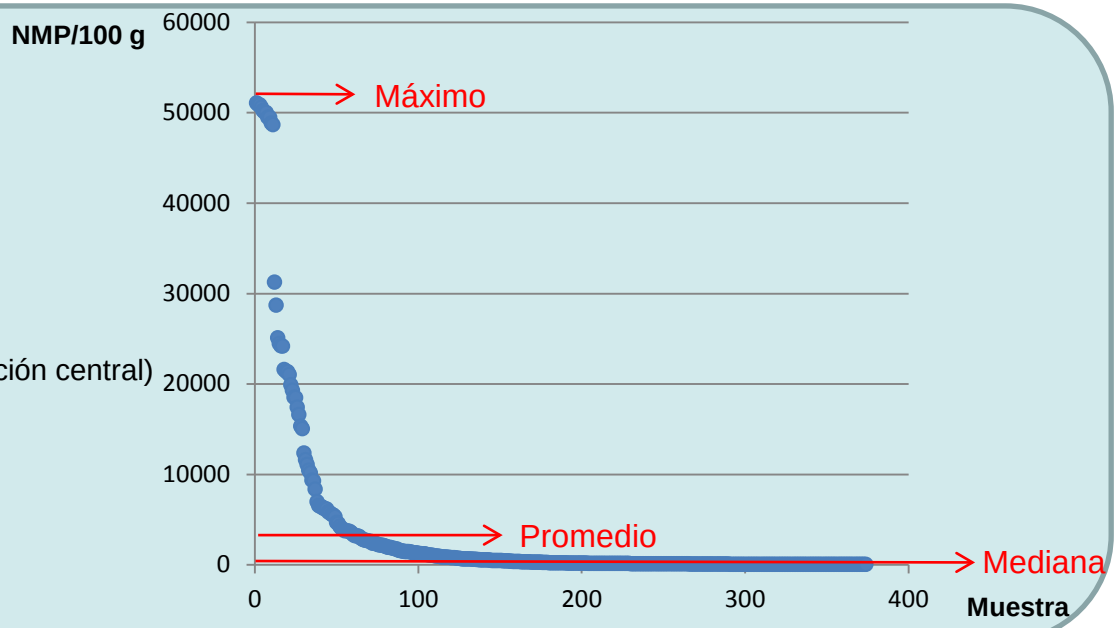


Salubridad de las playas. Resultados

Arena playa

Muestras con presencia de Enterococos

Máximo: 51.046 NMP/100 g
Promedio: 2.930 NMP/100 g
Mediana : 185 NMP/100 g (valor de posición central)

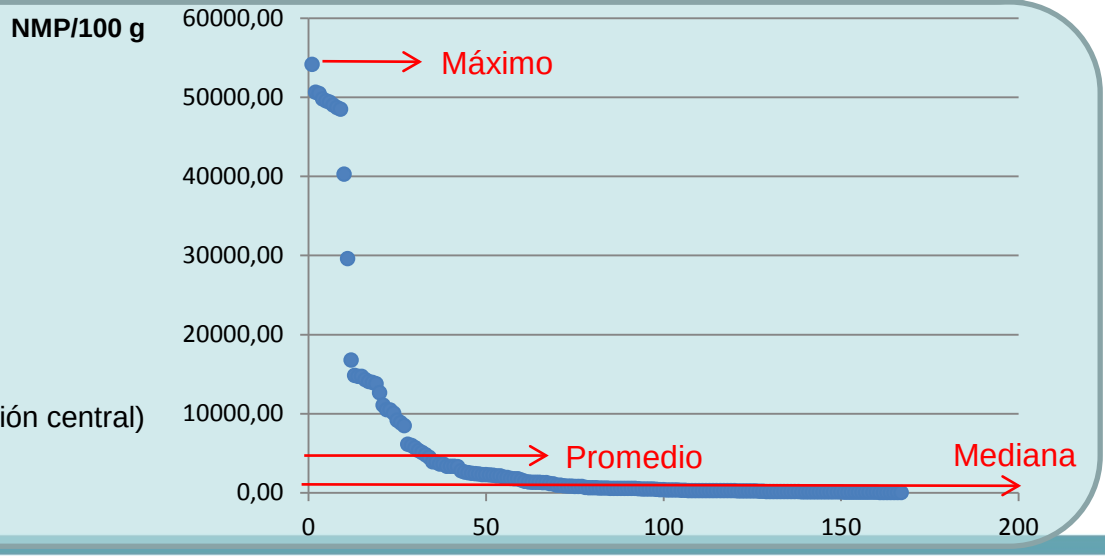


Óptima	< 100 NMP/100 g
Buena	100-10.000 NMP/100 g
Deficiente	> 10.000 NMP/100 g

Arena perimetral duchas

Muestras con presencia de Enterococos

Máximo: 54.129 NMP/100 g
Promedio: 4.635 NMP/100 g
Mediana : 558 NMP/100 g (valor de posición central)



Salubridad de las playas. Resultados

	Valor imperativo (Enterococos)
I. Pasteur	1.000.000 NMP/100 g
AMB, Aj. BCN, Dipsalut	10.000 NMP/100 g
Portugués	2.000 NMP/100 g

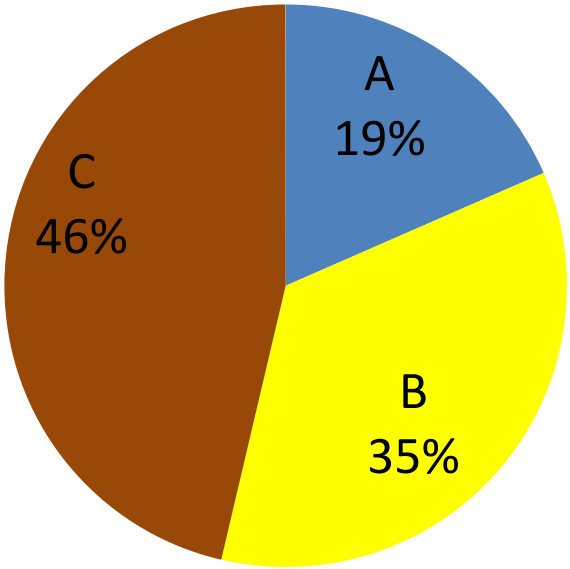
Arena perimetral duchas	Arena playa
0% muestras deficientes	0% muestras deficientes
13% muestras deficientes	6 % muestras deficientes
30% muestras deficientes	14 % muestras deficientes

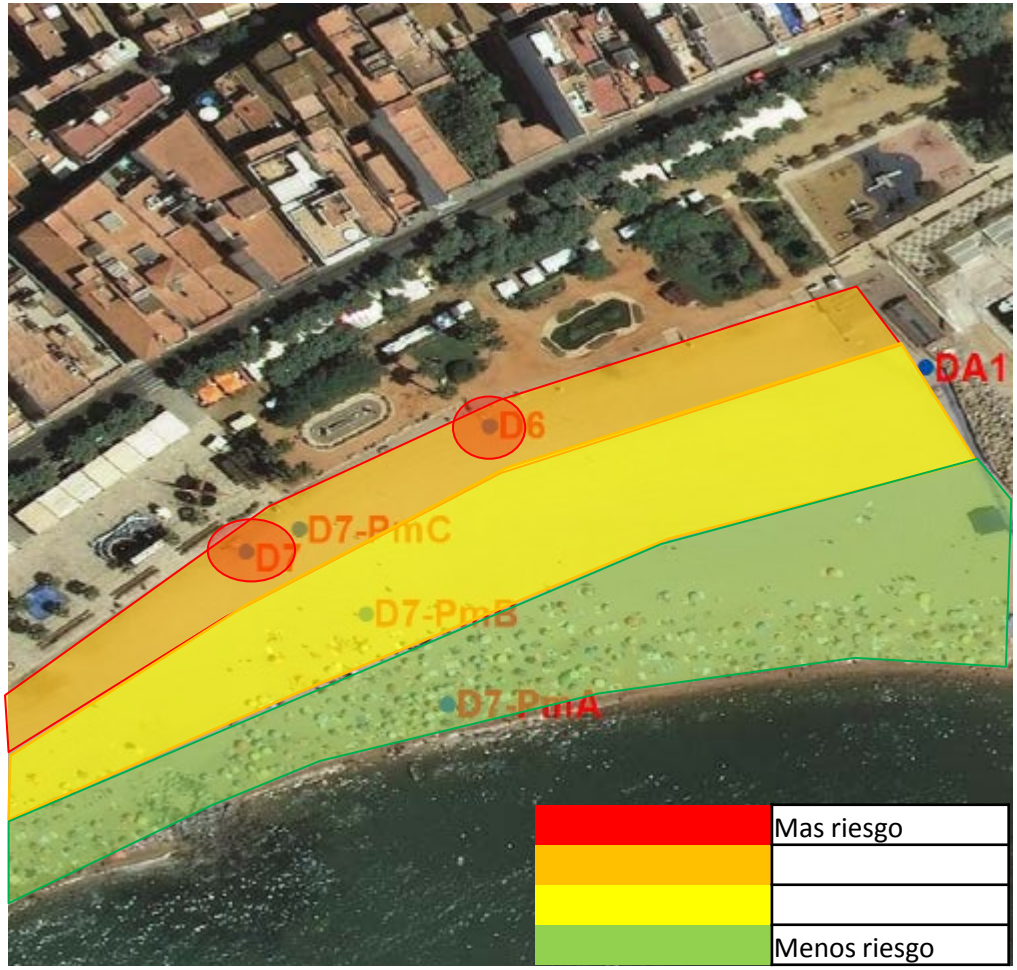
Falta de normalización

Salubridad de las playas. Resultados

80% playas con resultados aceptables y/o no satisfactorios (> 100 NMP/100 mg)

Distribución espacial de resultados
muestras > 100 NMP/100 mg Enterococos





Distribución espacial del nivel de riesgo de contaminación fecal detectado en playas

Salubridad de las playas. Resultados

Zonas de mayor riesgo:

- Arenas próximas a duchas
- Zonas próximas a paseo marítimo
- Playas urbanas
- Arenas próximas a rompiente de ola tras lluvias
- Arenas próximas a salidas de pluviales, torrentes o rieras…
- Playas cercanas a zona de influencia de descargas del sistema unitario (DSU)

LABAQUA

Salubridad de las playas. Referencias

Dipsalut
Organisme de Salut Pública
de la **Diputació de Girona**

Ajuntament d'Alcúdia

EXCMO. AYUNTAMIENTO DE CÁDIZ
ÁREA DE MEDIO AMBIENTE
DELEGACIÓN DE PLAYAS

Ayuntamiento de Torrevieja

- Programa de soporte a la gestión del riesgo sanitario en las playas de la provincia de Girona.Diputació de Girona. Dipsalut, 2013-2014
- Control de arenas en las playas de Cádiz. Ayuntamiento de Cádiz, 2013.
- Control de Aguas de Baño en las playas de Cádiz. E.M. Aguas de Cádiz, 2011, 2012 y 2013
- Control de las aguas de baño, provincia de Alicante. Conselleria de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda de la GV, 2001, 2010, 2013
- Estudio de calidad de las aguas de las playas de Motril. CH2MGILL. 2002.
- Perfil de playas en Torremolinos. AQUA AMBIENTE.
- Control de las aguas de baño en el litoral municipal, Ayuntamiento de Torrevieja, 2009- 2012
- Control de las aguas de baño en las playas de Torremolinos (Málaga). ASTOSAM, 2010, 2011
- Control de las aguas de baño en las playas de Las Palmas de Gran Canaria, FCC, 2011
- Control de las aguas de baño, Comunidad Valenciana. Conselleria Territorio y Vivienda de la Generalitat Valenciana, 2007
- Control de las aguas de baño en la playa de San Gabriel de Alicante, Ayuntamiento de Alicante, 2006.
- Control de las aguas de baño, provincia de Alicante, Valencia y Castellón, DG de calidad del Agua. Conselleria Medio Ambiente de la G. V.,2002-2005, 1997-1999.