

ESTUDIO DE LA SALMONELLA EN EL AGUA DE MAR DE LAS PLAYAS DE LA CIUDAD DE BARCELONA

A.M. Isern Viñas / M.D. Ferrer Escobar / F. Fernández Pérez

Servicio de Microbiología. Laboratorio Municipal de Barcelona

Resumen

Durante dos períodos de nueve meses el control microbiológico habitual de la calidad sanitaria del agua de mar de las playas de la ciudad de Barcelona, se complementó con el estudio de *Salmonella*. Para ello se analizaron 204 muestras de agua de mar tomadas en seis puntos de la zona litoral de la ciudad. La técnica de concentración utilizada fue la filtración a través de membrana de 0,45 micras de poro, efectuándose un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada.

En 45 muestras de las 204 analizadas (22%) se detectó la presencia de *Salmonella*. Se aislaron 69 cepas que correspondían a 34 serovars diferentes, siendo *Salmonella infantis* el más frecuente. El 88,9% de las aguas en las que se aislaron salmonelas presentaban una concentración de coliformes fecales superiores a 1000 ufc/100 ml, y el 97,8% unos niveles de estreptococos fecales a 100 ufc/100 ml.

Palabras clave: Salmonella. Agua de mar. Indicadores de contaminación fecal.

STUDY OF SALMONELLA IN THE SEA WATER OF THE CITY OF BARCELONA BEACHES

Summary

During two nine month periods the usual microbiological control of the seawater of the city of Barcelona beaches was complemented by the study of *Salmonella*. 204 samples of seawater taken at six points on the coastal zone of the city were analysed. The concentration technique used was the filtration by 0.45 µm porous membrane, having added tamponated peptone to water.

Salmonella was detected in 45 of the 204 samples analysed (22%). 69 strains corresponding to 34 different serotypes were isolated, the most frequent being *Salmonella infantis*. 88.9% of the water in which salmonella was isolated was found to have a concentration of faecal coliforms higher than 1000 ufc/100 ml and 97.8% showed levels of faecal streptococci higher than 100 ufc/100 ml.

Key words: Salmonella. Sea water. Indicators of faecal contamination.

Introducción

El control microbiológico de la calidad sanitaria del agua de mar se basa en el recuento de microorganismos indicadores de contaminación bacteriana fecal¹. En zonas de elevada densidad demográfica cuyo medio marino recibe gran cantidad de vertidos domésticos e industriales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUME)², recomiendan el estudio de patógenos entéricos -principalmente *Salmonella*- ya que no existe siempre correlación entre microorganismos y los indicadores de contaminación fecal³.

La amplitud del problema de la presencia de *Salmonella* en los medios acuáticos naturales se desconoce debido a la ausencia de estudios

bacteriológicos sistemáticos, ya que aunque algunos autores, Moore⁴, O'Shanahan⁵, Garay⁶, etc. han aislado salmonelas en aguas de mar, ríos y/o lagos, la complejidad de técnicas que ello requiere agravado por la ausencia de un método normalizado, hace que su investigación no se incluya en los programas de vigilancia habituales.

En el presente trabajo exponemos los resultados obtenidos en el estudio de *Salmonella* en el agua de mar de la ciudad de Barcelona, investigación que creemos de interés dado que la *Salmonella* es el principal microorganismo enteropatógeno en nuestro país y por considerar su presencia en el agua de mar accidental y debida a vertidos recientes. Los objetivos primordiales del estudio han sido constatar la presencia de esta enterobacteria en el agua de mar de nuestra ciudad, comprobar su relación con

los indicadores de contaminación bacteriana fecal y determinar los serovars de las cepas aisladas como marcadores epidemiológicos de interés.

Material y métodos

Se han analizado 204 muestras de agua de mar durante dos períodos de nueve meses, de Octubre de 1983 a Junio de 1984 (96 muestras) y de Octubre de 1984 a Junio de 1985 (108 muestras), correspondientes a las aguas que con periodicidad semanal o quincenal nos remite el Servicio de Hidrología de la Unidad Operativa de Sanidad Ambiental del Ayuntamiento de Barcelona para el control microbiológico habitual, consistente en el recuento de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y es-

Figura 1. Situación de los puntos de toma de muestras en el litoral de la ciudad de Barcelona

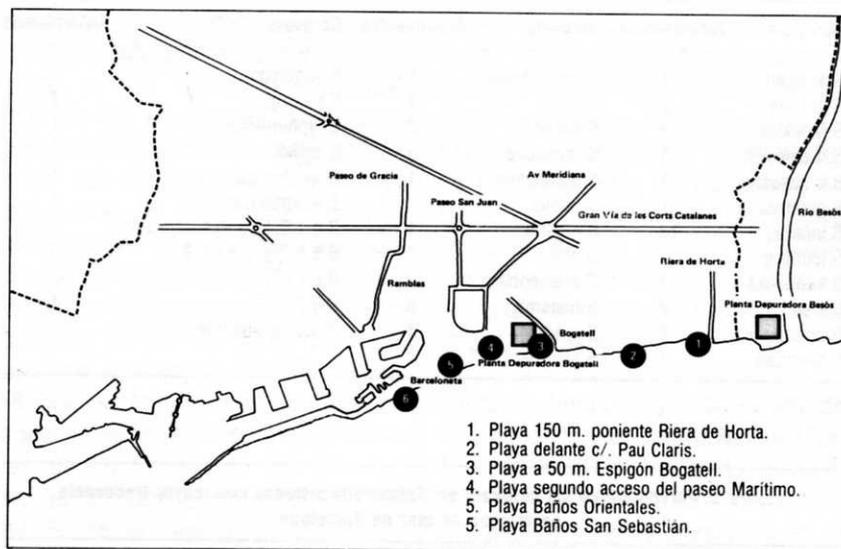


Tabla 1. Porcentaje de muestras de agua de mar recogidas en seis puntos del litoral de la ciudad de Barcelona en las que se han aislado *Salmonella*, durante los dos períodos estudiados

PERÍODOS	PUNTOS DE TOMA DE MUESTRA						TOTAL
	1	2	3	4	5	6	
Octubre 1983-Junio 1984	25 %	25 %	12,5%	25 %	12,5%	6,2%	17,7%
Octubre 1984-Junio 1985	22,2%	33,3%	33,3%	33,3%	16,6%	16,6%	25,9%

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras de agua de mar en las que se han detectado *Salmonella* según los diferentes niveles de contaminación por CF

CF ufc/100 ml	N. de muestras	N. de muestras <i>Salmonella</i> +	%
0	2	0	-
< 10 ²	21	1	4,8
10 ² -10 ³	47	4	8,5
10 ³ -10 ⁴	80	19	23,7
10 ⁴ -10 ⁵	42	11	26,2
> 10 ⁵	12	10	83,3

Tabla 3. Número y porcentaje de muestras de agua de mar en las que se ha detectado *Salmonella* según los diferentes niveles de contaminación por EF

EF ufc/100ml	N. de muestras	N. de muestras <i>Salmonella</i> +	%
0	7	0	-
< 10 ²	17	1	5,9
10 ² -10 ³	88	16	18,2
10 ³ -10 ⁴	66	11	16,7
10 ⁴ -10 ⁵	20	13	65,0
> 10 ⁵	6	4	66,7

treptococos fecales (EF), y para cuya determinación se utiliza la técnica de filtración por membrana⁷. Dichas muestras se tomaron en seis puntos de la zona litoral de Barcelona, cuya localización se indica en la figura 1 recogiendo de acuerdo con la metodología descrita en trabajos anteriores⁸.

La técnica microbiológica utilizada consiste, en primer lugar, en efectuar una concentración de la muestra filtrando 100 ml de agua a través de una membrana de 0,45 μm de poro (Millipore ref. HAWG 047 SI). A continuación la membrana se introduce en un matraz de 250 ml que contiene

100 ml de agua peptona tamponada (Merck ref. 7228), agitándose durante un minuto e incubándose a 37° C durante 20 horas. El enriquecimiento se efectúa transfiriendo 10 ml de este cultivo a 10 ml de caldo Selenito doble concentrado (Merck ref. 7717) y 0,1 ml a 10 ml de caldo Vassiliadis Rappaport⁹ R10/43°C, incubándose a 37° C y 43° C respectivamente durante 48 horas. El aislamiento se realiza en agar *Salmonella-Shigella* (S-S) (Oxoid ref. CM 99) y agar verde brillante rojo frenol (Merck ref. 7237) con desoxicolato sódico (Merck ref. 6504) al 2,5%. Las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* se someten a una identificación presuntiva y confirmativa según Le Minor¹⁰. La determinación del serovar se lleva a cabo mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos utilizando antisueros comercializados (Difco, Inst. Pasteur, Behring). En algunos casos para el estudio de antígenos flagelares es necesario practicar la inversión de fase, que se efectúa de acuerdo con la técnica descrita por Sven Gard¹⁰.

Resultados

De las 204 muestras de agua de mar analizadas se obtuvieron (tabla 1) 45 muestras con aislamiento positivo de *Salmonella* (22%), 17 correspondientes al primer período (17,7%) y 28 al segundo (25,9%), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de aislamiento obtenidos en los dos períodos estudiados.

En las tablas 2 y 3 se indican el número y porcentaje de muestras en las que se han detectado salmonelas según los distintos niveles encontrados de contaminación por CF y EF respectivamente.

De las 45 muestras positivas se aislaron 69 cepas de *Salmonella* que correspondían a 34 serovars diferentes. En la tabla 4 se indican los serovars de *Salmonella* aislados en aguas de mar. *Salmonella infantis* fue el que se aisló mayor número de

veces (38,3%), seguido de *Salmonella panamá* (17,6%) y *Salmonella mendoza* (8,8%). En el 37,8% de las muestras de aguas de mar en las que se detectó la presencia de salmonelas se obtuvo más de un serovar por muestra analizada (tabla 5), habiéndose obtenido en su caso hasta cinco serovars diferentes en una muestra.

En la tabla 6 se muestra la distribución de la cepas en los distintos serogrupos de *Salmonella*. La mayoría (44,9%) pertenecían al serogrupo C. Las salmonelas aisladas pertenecían al subgénero I (87%) y al subgénero II (13%) de Kauffmann¹¹.

Discusión

El estudio de *Salmonella* en aguas, constituye uno de los capítulos más atractivos de la Microbiología de los medios acuáticos naturales contaminados, habiendo interesado a bacteriólogos de todo el mundo^{12, 13, 14, 15, 16}. Entre otros trabajos, destaca el de Moore en Gran Bretaña⁴, el cual aisló salmonelas en el 30,4% de las muestras analizadas, el de O'Shanahan en Gran Canaria⁵ que encontró salmonelas en el 20% de las muestras de aguas de mar y Pumarola¹⁷ en Barcelona que obtuvo un 4,2% de muestras positivas.

Los resultados de este último estudio efectuado en Barcelona -de octubre de 1980 a diciembre de 1981- sobre 396 muestras procedentes de las mismas zonas de muestreo que las de nuestro trabajo, no son comparables con los obtenidos por nosotros, debido a las modificaciones que hemos introducido en la metodología convencional, especialmente en lo que hace referencia al enriquecimiento en el caldo R10/43° C y el pre-enriquecimiento en el agua de peptona tamponada. Esta técnica descrita por Edel y Kamplmacher¹⁸ en 1973 es actualmente utilizada con buenos resultados^{12, 19, 20, 21} en el aislamiento de microorganismos patógenos sometidos a condiciones extremas o poco favorables, en combinación con los caldos de enriquecimiento selectivo.

Tabla 4. Serovars de *Salmonella* aislados en el agua de mar de Barcelona

Serovars	Aislamientos	Serovars	Aislamientos	Serovars	Aislamientos
S.anatum	1	S.leopoldville	1	S.sandiego	2
S.assinié	2	S.lomé	1	S.tilburg	2
S.blockley	1	S.llandoff	2	S.typhimurium	1
S.II caledon	1	S.mendoza	3	S.ughelli	1
S.II canastel	1	S.muenchen	1	S.veybridge	1
S.glostrup	1	S.ndolo	1	S.worthington	1
S.infantis	13	S.nigeria	1	S.II 1,9,12:g,m,s,t:1,5:z ₄ 2	5
S.jedburg	1	S.ohio	1	S.II 6,7:g,m,s,t:z ₄ 2	3
S.kimuenza	1	S.oranienburg	2	S.6,7:b:-	2
S.kisii	2	S.panama	6	S.6,7:-:-	1
S.larochele	2	S.reading	1	S.autoaglutinable	1
S.lawndale	1	S.saintpaul	2		

Figura 2. Porcentaje de los serovars de *Salmonella* aislados con mayor frecuencia en el agua de mar de Barcelona

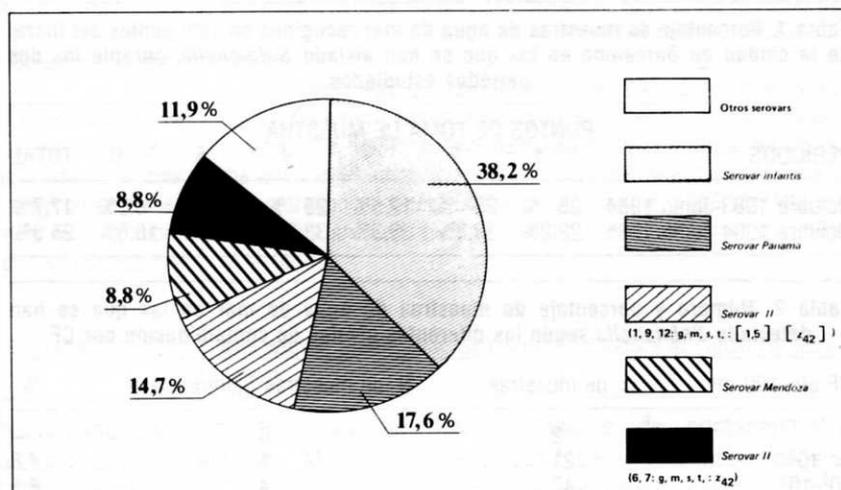


Tabla 5. Número y porcentaje de muestras en las que se aislaron 1 o más serovars de *Salmonella*

Período	1 serovar	2 serovars	3 serovars	4 serovars	5 serovars	1 serovar
1.º período	10 (58,8%)	4 (23,5%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)	7 (41,2%)
2.º período	18 (64,3%)	9 (32,1%)	1 (3,6%)	-	-	10 (35,7%)
TOTAL	28 (62,2%)	13 (28,9%)	2 (4,5%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	17 (37,8%)

Tabla 6. Distribución de las cepas aisladas en agua de mar en los serogrupos de *Salmonella* en los dos períodos estudiados

SEROGRUPO	1.º PERÍODO Octubre 1983- Junio 1984		2.º PERÍODO Octubre 1984- Junio 1985		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
A	0	-	0	-	0	-
B	4	12,9	4	10,5	8	11,6
C	14	45,1	17	44,7	31	44,9

Diversos autores, Geldreich²², Moore⁴, O'Shanahan⁵, etc..., han demostrado un aumento en la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* en aguas de mar cuando la concentración de CF es elevada. En nuestro trabajo, dicha frecuencia está relacionada con la tasa de CF y EF. La proporción de resultados positivos aumenta de 7,7% en las aguas que contienen menos de 10³ CF/100 ml a 24,6% en las aguas que albergan entre 10³ y 10⁵ CF/100 ml (P<0,01). El máximo porcentaje de aislamiento -83,3%- se ha encontrado asociado a aquellas aguas que presentaban niveles de contaminación por CF muy elevados, superiores a 10⁵ ufc/100 ml. Respecto a los EF, se observa un aumento significativo en la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* cuando se sobrepasa la cifra de 10⁴ EF/100 ml (P<0,001).

No obstante en algunos estudios se ha detectado *Salmonella* en aguas consideradas poco contaminadas según los valores de los indicadores de contaminación fecal. Así, Fair y Morrison¹⁵ aislaron salmonelas en muestras que contenían menos de 50 CF/100 ml y Claudon¹⁴ incluso en ausencia de CF. En nuestro trabajo, no se han aislado salmonelas en agua sin CF, pero sí en muestras que presentaban niveles bajos, concretamente en dos casos en los que la cifra de CF/100 ml era inferior a 200.

La mayoría de las cepas aisladas (87%) pertenecen al subgénero I de Kauffmann, que comprende las cepas obtenidas preferentemente de animales de sangre caliente, y en particular del hombre^{23, 24}. Al subgénero II corresponden el 13% restante. El hábitat de estas cepas se relaciona con animales de sangre fría y el medio ambiente^{23, 10, 24} y aunque su capacidad patógena para el hombre se considera menor que las del subgénero I^{25, 26}, también se han aislado en gastroenteritis y otros procesos patógenos^{26, 27}.

Del estudio antigénico se obtuvo una gran diversidad de serovars, perteneciendo las 69 cepas aisladas a 34 serovars diferentes. Esta variabilidad observada concuerda con los resultados obtenidos por otros autores en el

estudio de aguas: Moore⁴ aisló 28 serovars, Plante¹⁶ obtuvo también 28, Alcaide¹² halló 36 serovars, etc.

La *Salmonella infantis*, serovar aislado con mayor frecuencia en nuestro estudio y también en el de Alcaide¹² y Pumarola¹⁷, ha aumentado paulatinamente su frecuencia en clínica en los últimos años²⁸. No obstante, de los 34 serovars aislados, únicamente el 32,3% figuran en las listas de cepas de *Salmonella* de origen humano tipificadas por el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda y el Centro Nacional de Sanidad durante los años 1983²⁸, 1984^{29, 30} y 1985³¹. Ello se debe a que las salmonelas presentes en el agua de mar corresponden sólo en parte a las cepas procedentes de las poblaciones humanas de las zonas muestreadas, desempeñando los pájaros migratorios, rodeores y animales domésticos un papel importante en el transporte de estos microorganismos al mar¹³.

La presencia de *Salmonella* en nuestro medio marino supone una situación similar a la observada en otras poblaciones con abundantes vertidos al mar, verificándose en nuestra ciudad la afirmación de Brisou¹³ de que todas las grandes aglomeraciones costeras del mundo pueden en un momento dado aportar salmonelas a su medio marítimo, el cual puede representar una ruptura de la cadena epidemiológica de la *Salmonella* o bien un eslabón más en su transmisión al hombre.

Bibliografía

1. BOE 151, pag. 14247-14246 de 25 de junio de 1977.
2. OMS. *Project pilote commun OMS/PNNE sur le controle de la qualite des eaux cotieres en Mediterranée*. Roma: OMS, 1977.
3. APHA, AWWA. WPCF. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater*. 16 ed. Washington: APHA, 1985.
4. Moore B. *Proceedings 1th Intern Conf on Waste Disposal in Marine Envir*. London: Pearson, Pergamon, 1960.
5. O'Shanahan L, Medina A, Santana C. Estudio de *Salmonella* y *Vibrio cholerae* en aguas de mar residuales. IX Congreso Nacional de Microbiología.

Valladolid: Comité Organizador del IX Congreso Nal. de Microbiología, 1983.

6. Garay E, Martínez JP, Hernández E. Aislamiento e identificación de salmonelas en el Albufera de Valencia. *Rev Agroquim Tecnol Aliment* 1978; 18: 119-124.

7. APHA, AWWA. WPCF. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater*. 15 ed. Washington: APHA, 1980.

8. Ferrer MD, Hernández M, Isern AM, Subirá M. Evolución de la contaminación fecal en el agua de las playas de la ciudad de Barcelona. *Gaceta Sanitaria de Barcelona* 1983; 9: 100-103.

9. Vassiliadis P, Trichopoulos D, Papadakis J, Kalapothaki V, Zavitsanos X, serie CH. *Salmonella* isolation with Rappaport's Enrichment Medium of Different Compositions. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* 1981; 173: 382-289.

10. Le Minor L. *Le diagnostic de laboratoire des Entérobactéries*. 3ª ed. St. Maudé: Aditions La Tourelle, 1987.

11. Kauffman F. *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. Copenhagen: Munksgaard, 1966.

12. Alcaide E, Martínez JP, Garay E. Comparative study on *Salmonella* isolation from sewage contaminated natural waters. *J Appl Bacteriol* 1984; 56: 365-371.

13. Brisou JF, Denis FA. *Hygiène de l'environnement maritime*. Paris: Masson, 1978.

14. Claudon DG, Thompson DI, Christenson EH, Lawton GW, Dick EC. Prolonged *Salmonella* contamination of a recreational lake by runoff waters. *Appl Microbiol* 1971; 21: 875-877.

15. Fair JF, Morrison SM. Recovery of bacterial pathogens from high quality surface waters. *Waters Resour Res* 1967; 3: 799-803.

16. Plante R, Coprioll T, Drapeau AJ, Kasatiya SS. Les *Salmonella* dans les eaux de surface et d'égout de la région de Montreal. *Eau de Quebec* 1978; 11: 199-204.

17. Pumarola T. *Estudio sobre las técnicas de aislamiento y el grado de contaminación de las aguas residuales de Barcelona por microorganismos del género Salmonella*. Barcelona: Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, 1984. Tesis Doctoral.

18. Edel W, Kampelmacher EI. Comparative studies on isolation methods of «sublethally» injured *Salmonellae* in nine European laboratories. *Bull Wild Health Org* 1973; 48: 167-174.

19. Monzón C, González-Lama Z, López-Orge RH. *Salmonella* en aguas residuales: comparación de tres métodos de aislamiento. *Rev Esp Microbiol Clin* 1986; 1: 299-302.

20. Svenne WH, Kraft AA. Recovery of *Salmonellae* from foods using a combined enrichment technique. *J Foff Sci* 1981; 46: 94-99.

21. Vassiliadis P, Trichopoulos D, Kalapothaki U, serie CH. Isolation of *Salmonellae* with the use of the R10 modification of Rappaport enrichment medium *J Hyg* 1981; 87: 35-41.

22. Geldreich EE. Applying bacteriological parameters to recreational water quality *J Am Water Works Assoc* 1970; 62: 113-120.

23. Krieg NR, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore, London: Williams y Wilkins, 1984.

24. Le Minor L. Evolution du problème des

Salmonelloses dans le monde. *Bull Acad Nat Méd* 1980; 164: 524-527.

25. Le Minor L. Enterobactéries: test du Galacturonate. *Ann Microbiol* 1979; 130 B: 305-312.

26. Prats G. Aislamiento de *Salmonella* de los subgéneros II-IV en el hombre. *Enf Inf Microbiol Clín* 1986; 4: 72-73.

27. Rohde R. The identification, epidemiology and pathogenicity of the *Salmonella* of subgenus II. *J Appl Bact* 1965; 28: 368-372.

28. Anónimo. Tipificación de *Salmonellas* 1983. *Boletín Epidemiológico Semanal* 1984; 1.654: 265-267.

29. Anónimo. Tipificación de *Salmonellas* 1984

(I). *Boletín Epidemiológico Semanal* 1985; 1.694: 180-181.

30. Anónimo. Tipificación de *Salmonellas* 1984 (y II). *Boletín Epidemiológico Semanal* 1985; 1.695: 188-190.

31. *Boletín Microbiológico Semanal* (BMS) 1986; Semana 24: 7-10.

