



Universidad
Politécnica
de Cartagena

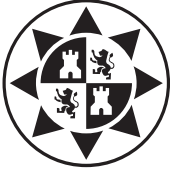


Máster Universitario en
Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

PRESENCIA DE *LEGIONELLA* *PNEUMOPHILA* EN CONDENSADORES EVAPORATIVOS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DEL AGUA

Alumno: Antonio Manuel Castaño Villar
Directores: Antonio López Gómez
Alfredo Palop Gómez

Cartagena, Julio de 2012



AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. ANTONIO LÓPEZ GÓMEZ y D. ALFREDO PALOP GÓMEZ

EN CALIDAD DE DIRECTORES INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Presencia de *Legionella pneumophila* en Condensadores Evaporativos y su Relación con las Características del Agua”,
ha sido realizado por D. Antonio Manuel Castaño Villar, bajo la dirección y supervisión de
D. Antonio López Gómez y D. Alfredo Palop Gómez
y que se autoriza al alumno a la defensa del mismo.

En Cartagena, a 9 de Julio de 2012

Fdo.: Antonio López Gómez

Fdo.: Alfredo Palop Gómez

Este trabajo ha sido presentado en el 22nd *International Congress of Refrigeration*, ICR – 2007.

Referencia:

Castaño, A.M., Hernández, M.E., López, A., Palop, A. 2007. “Presence of *Legionella pneumophila* in evaporative condensers and its relation with the characteristics of the water”. *Proc. 22 International Congress of Refrigeration*, IIR Conference, Beijing (China).

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Materiales y métodos	4
Resultados y discusión	5
Conclusiones	13
Referencias	14

RESUMEN

Legionella es una bacteria que se encuentra ampliamente difundida en el medio acuático natural, a partir del cual puede pasar a colonizar la red de abastecimiento y distribución de agua pública e incorporarse a las instalaciones frigoríficas industriales que utilizan agua.

En particular, los condensadores evaporativos, son unos equipos de enfriamiento, que emiten a la atmósfera aerosoles susceptibles de contener *Legionella*, pues en estos equipos se dan una serie de factores que favorecen su proliferación y dispersión.

Por eso se caracterizaron y muestrearon durante 5 meses una serie de condensadores con servicio a instalaciones de frío industrial, localizados en empresas ligadas al sector agroalimentario.

Se determinaron las características físicas y químicas más relevantes de las aguas utilizadas en los condensadores. Además, se analizó la presencia de amebas y otros protozoos, se determinó el número de microorganismos aerobios totales, y se estudió la presencia de *Legionella* spp.

Las características físicas y químicas del agua demostraron, al sobrepasar los niveles recomendados, que el agua de los condensadores evaporativos presenta una calidad pobre, haciendo de ellos unas instalaciones de alto riesgo en cuanto a su colonización por *Legionella* spp., propiciando el deterioro del equipo e incidiendo sobre la eficacia de la desinfección.

La presencia de amebas y otros protozoos, algas como las diatomeas, así como la formación de biofilms en las superficies internas de los condensadores, debido a la entrada de luz solar y suciedad del exterior de los equipos, fue una circunstancia que se dio en la mayoría de las instalaciones muestreadas.

El recuento de microorganismos aerobios totales fue elevado en la mayoría de análisis realizados, inclusive en las ocasiones en las que la muestra se tomó poco después de realizarse una limpieza de la instalación. Esto indica que el sistema de desinfección utilizado es ineficaz y sugiere una reevaluación del mismo así como del mantenimiento realizado.

Los análisis mostraron presencia de *Legionella pneumophila* en determinados condensadores evaporativos, a pesar de que todas las instalaciones estaban sometidas a un tratamiento preventivo de limpieza y desinfección.

Los resultados revelaron que recuentos elevados de microorganismos, no siempre se encuentran ligados a la aparición de *Legionella*.

ABSTRACT

Legionella is a microorganism widely spread in the aquatic environment, from where it may reach the supplying and distribution network of public water and, eventually, the refrigeration systems of industrial facilities and buildings. Particularly, the evaporative condensers are cooling devices that spread aerosols to the air, susceptible of containing *Legionella*. In these equipments several factors that favour the development and dispersion of this microorganism take place.

Therefore, evaporative condensers placed in refrigeration systems of food factories were characterized and sampled during a 5 month period. The most relevant physical and chemical characteristics of waters used in these evaporative condensers were determined. Besides, the presence of amoebae and other protozoans was analyzed, the number of mesophilic aerobic microorganisms was determined, and the presence of *Legionella* spp. was studied.

The physical and chemical characteristics of the water exceeded the recommended levels in many cases, showing that the water of the evaporative condensers had a poor quality. These poor characteristics make these facilities of high risk regarding colonization by *Legionella* spp. They also may hamper the effectiveness of disinfection and may lead to the deterioration of the equipment.

Most of the sampled facilities showed presence of amoeba and other protozoa, algae such as diatoms, as well as biofilm formation in the internal surfaces of condensers. The growth of these microorganisms was enhanced by sun light and dirtiness coming from the exterior of the facilities.

Mesophilic aerobic microorganism counts were high in most of the samples, including those taken shortly after cleaning the equipment. These high counts indicate that the methods of disinfection used are not efficient and suggests that a re-evaluation of these methods as well as of the maintenance of the equipments should be carried out.

The analysis showed *Legionella pneumophila* presence in some of the evaporative condensers, in spite that all the facilities were exposed to a preventive treatment of cleaning and disinfection.

The results also showed than high counts of microorganisms, are not always linked to *Legionella* presence.

1. INTRODUCCIÓN

Los condensadores evaporativos son unos de los equipos de enfriamiento con mayor riesgo de proliferación y dispersión de *Legionella*. En ellos el agua es pulverizada sobre una batería de tubos, que contiene un fluido refrigerante caliente, y a través de la cual se hace pasar una corriente de aire ascendente que provoca la evaporación del agua, arrastrando hacia el exterior gran cantidad de gotas que pueden estar contaminadas.

Los grandes volúmenes de aire movidos por los condensadores provocan la entrada de materia orgánica y otros restos al interior del equipo donde se desarrollan biofilms.

El uso de productos clorados para la desinfección del agua provoca la corrosión de los materiales del equipo y la elevada concentración de sales del agua de aporte da lugar a la formación de incrustaciones, por lo que la instalación se convierte en un nicho ecológico adecuado para *Legionella*.

La falta de diseño higiénico hace que la contaminación microbiana y el ensuciamiento del equipo sean aún más fáciles de producirse, y dificultará las labores de limpieza de los equipos. El objetivo del trabajo ha consistido en investigar la presencia de *Legionella pneumophila* en aguas de condensadores evaporativos sometidos a tratamiento bactericida en continuo y operaciones de limpieza y desinfección periódicas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se caracterizaron y analizaron durante 5 meses 10 instalaciones repartidas por distintos puntos geográficos de la Región de Murcia (España), realizándose un total de 38 análisis.

Los muestreos se realizaron desde finales de primavera hasta principios de otoño de 2006, coincidiendo con la época en la que la mayoría de los brotes de legionelosis aparecen. La frecuencia de muestreo fue de 1 análisis cada 15 – 20 días, en función del estado de limpieza y mantenimiento del condensador estudiado, así como de los resultados analíticos de cada muestra de agua analizada.

Se determinaron características físicas y químicas de las aguas utilizadas en los condensadores antes y después de limpiar. Analizándose la dureza total, el contenido en hierro y cloro activo por colorimetría, cloruros y manganeso por absorción atómica, sólidos totales por gravimetría, temperatura, pH, y conductividad eléctrica.

Se determinaron asimismo, las características microbiológicas del agua de los condensadores. Se analizó la presencia de amebas y otros protozoos mediante el cultivo en agar bacteriológico no nutritivo, incubación a 25 °C durante 2 días y la observación al microscopio de contraste de fases.

Se realizó el recuento total de microorganismos aerobios mesófilos por siembra en placa con homogeneización en masa, e incubación a 30 °C durante 2 días.

La presencia de *Legionella* spp. se estudió mediante el método descrito en las normas ISO 11731:1998 e ISO 11731-2:2004 por siembra en agar GVPC y confirmación en agar BCYE y agar BCYE sin cisteína. La confirmación de colonias sospechosas se realizó mediante pruebas de aglutinación de látex (OXOID, Basingstoke, Reino Unido).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros físicos y químicos del agua se pueden relacionar con el estado de limpieza del equipo, además de con la calidad intrínseca del propio líquido.

La figura 1 muestra los valores de pH registrados durante los análisis.

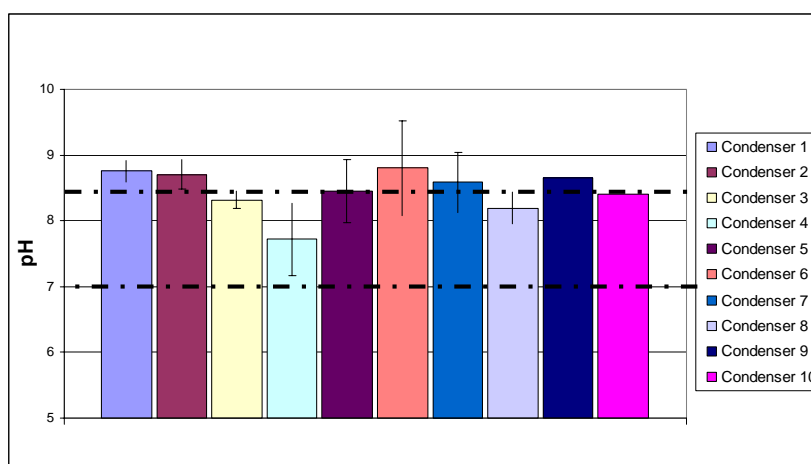


Figura 1. Evolución del pH del agua de la balsa de los condensadores.(Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar). Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

Aunque en algunas de las instalaciones se dan valores dentro de los límites recomendables, marcados por las dos líneas de trazos discontinuos, la tendencia general es a presentar unos valores por encima de lo aconsejable, de modo que la alcalinidad de este agua perjudicará a la efectividad del biocida dificultando su acción sobre los microorganismos. Además se observó un aumento del pH incluso después del vaciado, limpieza y desinfección de los equipos.

La utilización de desinfectantes en estos equipos es obligatoria. La desinfección se realiza de forma continua y casi siempre a través de sistemas de dosificación de bombas electromagnéticas. El desinfectante más usado es el cloro, que aunque es barato y eficaz cuando se dan unas condiciones adecuadas de higiene, no está dando buenos resultados en equipos con un mal mantenimiento y limpieza. Además, los niveles adecuados para la desinfección son difíciles de mantener en el agua, esto es porque no se utilizan sistemas totalmente automáticos y la demanda de desinfectante que hay en la balsa para mantener un nivel adecuado de cloro residual libre fluctúa mucho, con lo que el nivel de cloro activo en la balsa del equipo presenta valores muy dispares a lo largo del día. Por este motivo, la mayoría

de empresas optan por añadir unas cantidades de desinfectante demasiado altas, que además de ser ineficaces cuando los equipos están sucios, provocan un deterioro físico por corrosión que repercute en la disminución del rendimiento y vida útil del equipo.

La figura 2 muestra la disparidad de valores de desinfectante presente en el agua de cada equipo durante un periodo de 5 meses. Mayoritariamente fuera del rango aconsejado.

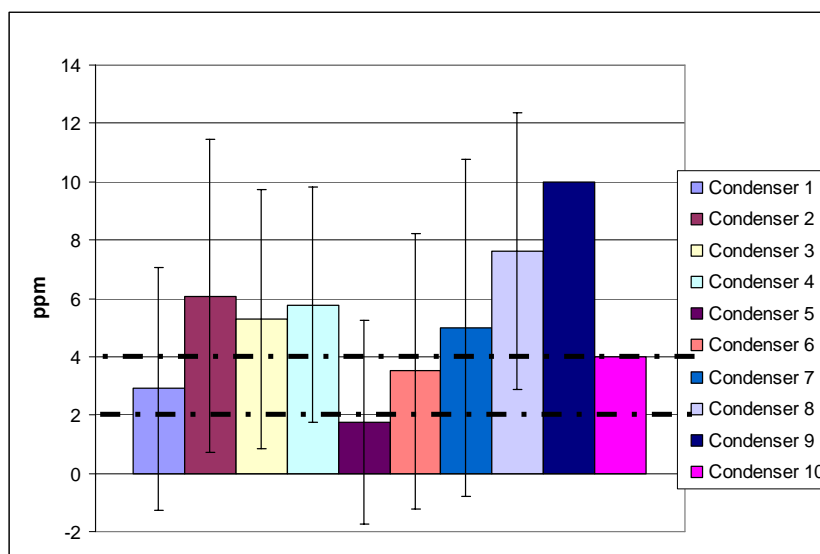


Figura 2. Evolución del nivel de cloro residual libre presente en el agua de enfriamiento. (Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar). Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

Los valores de pH y los niveles de biocida observados (figuras 1 y 2), junto con la presencia de suciedad orgánica que dificulta la acción bactericida, constituyen un riesgo evidente de cara a la proliferación microbiana dentro de los condensadores.

Se sabe que la temperatura del agua es un factor clave para el desarrollo de *Legionella pneumophila*. En nuestro estudio los valores de temperatura estaban siempre dentro de los rangos de riesgo de proliferación de *Legionella*, (datos no mostrados) por encima de 20 °C, (Stout *et al.* 1985), temperaturas por otro lado normales en esta época del año. El equipo donde más positivos de *Legionella* se encontraron es el que mayores valores de temperatura presentaba. Aún así, se observó que si el estado de limpieza es adecuado, una elevada temperatura, no va necesariamente ligada a recuentos elevados de microorganismos en estos equipos.

La conductividad eléctrica es una medida indirecta de la cantidad de sales que hay disueltas en el agua, y por lo tanto, ayuda a intuir tanto la calidad del agua como su poder incrustante.

La figura 3 presenta la evolución de la conductividad eléctrica del agua de los equipos muestreados.

Nuestros análisis muestran valores superiores a los 5000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en muchas ocasiones. El límite más consensuado entre fabricantes es 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y éste valor se superaba en la mayoría de los análisis. El agua de enfriamiento se va evaporando y reponiendo continuamente, quedando dentro del condensador las sales y sólidos que estaban disueltos en ella. Con esto se deduce que el agua contiene un importante contenido en sales que producirán incrustaciones y disminuirán el intercambio de calor y el rendimiento general del equipo.

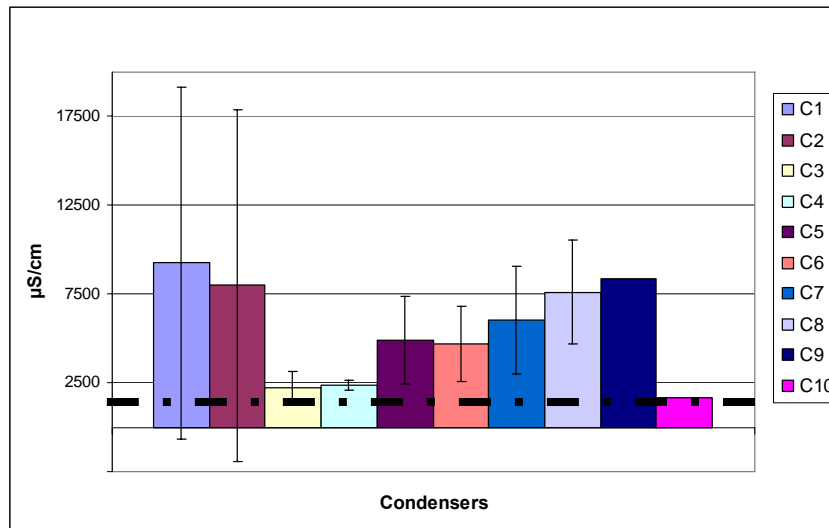


Figura 3. Conductividad eléctrica en la balsa de los condensadores.

(Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar). Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

La elevada concentración de sales se produce porque la purga del agua del sistema es insuficiente, por lo que estará acompañada de una acumulación excesiva de suciedad y materia orgánica, que servirá de alimento a los microorganismos.

Las barras de error en la gráfica son una clara muestra de la dificultad de mantener este parámetro dentro de unos valores aceptables en los condensadores actuales.

Los equipos que poseían medidores de la conductividad para, en base a ella, purgar el agua del sistema, presentaban mejor estado de limpieza que los demás. Este parámetro es de suma

utilidad, ya que empleándolo de forma adecuada, ayudará a mantener el equipo más limpio, disminuyendo la acumulación de sólidos disueltos y de materia orgánica y con ello el crecimiento microbiano. Además se producirán menos incrustaciones en el equipo lo que hará que *Legionella* tenga menos refugios dentro de él. Como contrapartida, en zonas donde la dureza del agua sea elevada, un sistema de purga controlado por la conductividad conllevará un gran consumo de agua.

Los sólidos totales constituyen el contenido total de sales y materia orgánica presentes en el agua, tanto disueltos como en suspensión. La figura 4 muestra los valores que se presentaron en las muestras analizadas de todos los condensadores.

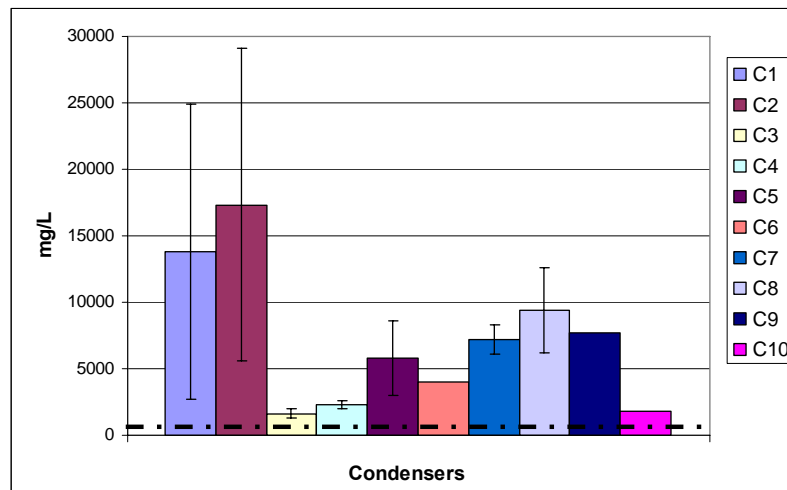


Figura 4. Residuo seco obtenido en el agua de cada condensador durante el estudio. (Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar). Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

Los condensadores presentaban valores elevados de sólidos totales incluso después de ser limpiados con métodos manuales usando máquinas de alta presión. Superando de este modo el límite aconsejado de 500 mg/L. Estos residuos presentes en el agua disminuyen la eficacia del bactericida e inducen un mayor deterioro de los equipos disminuyendo su vida útil. Además, sirven de alimento a los microorganismos que colonizan las superficies de los condensadores.

Parece, por tanto, que los métodos de limpieza utilizados no son eficaces para disminuir lo suficiente la suciedad de los equipos.

El mal mantenimiento, limpieza e higiene de los condensadores quedó reflejado también en otros parámetros estudiados. En general el agua poseía una dureza muy elevada, llegándose a registrar valores de 380 °F, figura 5. Esto demuestra su tendencia a la formación de incrustaciones, donde, la suciedad y microorganismos quedarán retenidos, y de dónde será más difícil limpiarlos y eliminarlos.

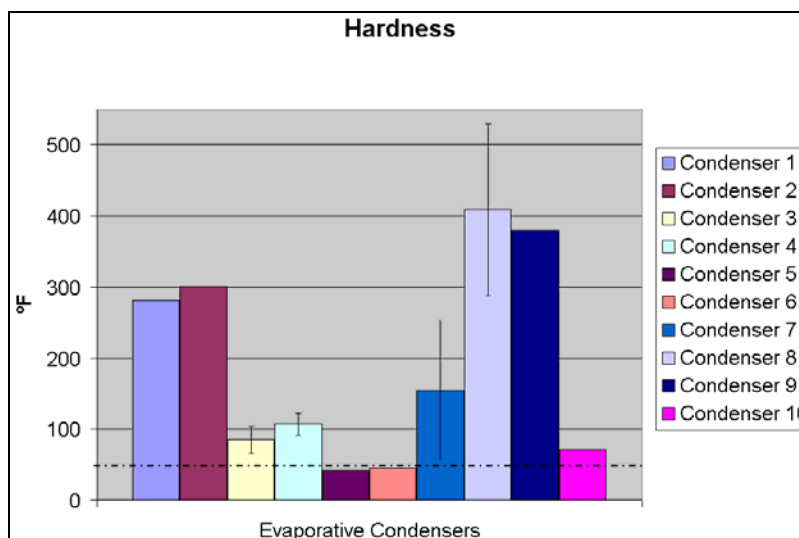


Figura 5. Dureza del agua recogida en la balsa de los condensadores.

(Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar). Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

Por otro lado la presencia de cloruros acelera el proceso de corrosión del acero. El 50% de los valores se encontraban entre 3000 y 4000 ppm de Cl^- y además el 100% de los valores medidos era superior al aconsejable, figura 6.

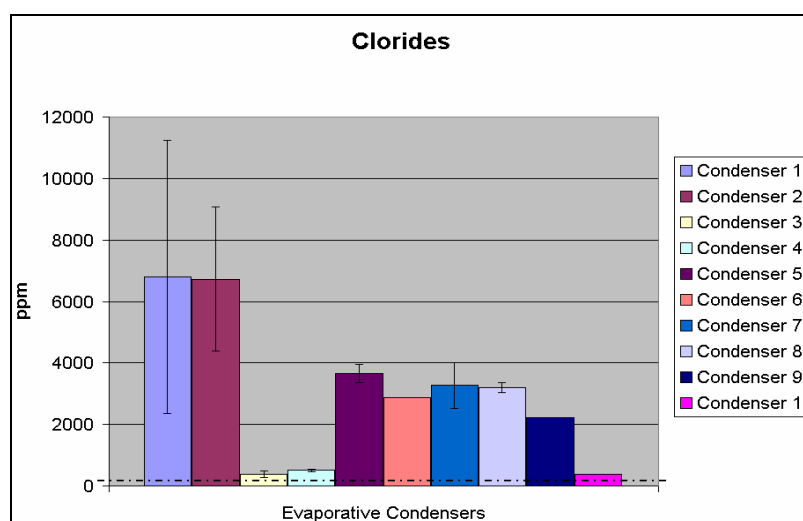


Figura 6. Cantidad de Cloruros presente en el agua de los condensadores.

(Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar). Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

Los productos de la corrosión (óxidos) serán una fuente extra de nutrición para los microorganismos que seguirán proliferando siempre que se den estas condiciones propicias. Así, la corrosión del equipo se manifestará de diferentes maneras inclusive llegando a perforar el paquete de tubos de intercambio térmico por donde se producirán pequeños escapes de gas que disminuirán el rendimiento del equipo.

Manganeso y magnesio, junto con el cinc y el hierro son elementos básicos para el desarrollo de *Legionella*. Sin embargo, los requerimientos de hierro y cinc son más importantes (Reeves, 1981), lo cual explica parcialmente el riesgo de proliferación de la bacteria en los condensadores evaporativos y torres de refrigeración fabricados en acero galvanizado, frente a otros materiales más adecuados.

El hierro es conocido como un nutriente esencial para el crecimiento de *Legionella pneumophila* y las bacterias gram-negativas necesitan por lo general una concentración 0.8 - 1.8 μM de hierro (James *et al.* 1995). *Legionella* es capaz de nutrirse inclusive en ambientes deficientes en hierro, de modo que hasta una concentración de 0.056 ppm de hierro le sería suficiente (Devos *et al.* 2005), además cuenta con la capacidad de alimentarse usando agentes quelantes (Liles *et al.* 2000).

En nuestro estudio el hierro aparecía por encima de los límites aconsejables y además, siempre que en un equipo se detectó *Legionella pneumophila* los niveles de hierro eran superiores a 0.1 ppm.

En lo que a microbiología se refiere, la mitad de las instalaciones muestreadas nunca llegaron a presentar unos recuentos recomendables de microorganismos totales a lo largo de todo el estudio, y el 61% de los análisis realizados superaban el nivel máximo aconsejado (10^4 UFC/ml).

En la figura 7 se presentan los valores de microorganismos aerobios de las aguas de enfriamiento.

La limpieza de los equipos no afectó eficazmente a la eliminación de microorganismos, ya que los recuentos de aerobios aumentaron después de la misma en el 56% de los análisis.

Se manifiesta por tanto la ineficacia de los sistemas de limpieza y desinfección utilizados para combatir la *Legionella*. Estos métodos, si se realizan de forma inadecuada, pueden hacer incluso que aumente la concentración de *Legionella* en el agua debido a que los biofilms no son eliminados completamente (Kramer y Ford, 1994).

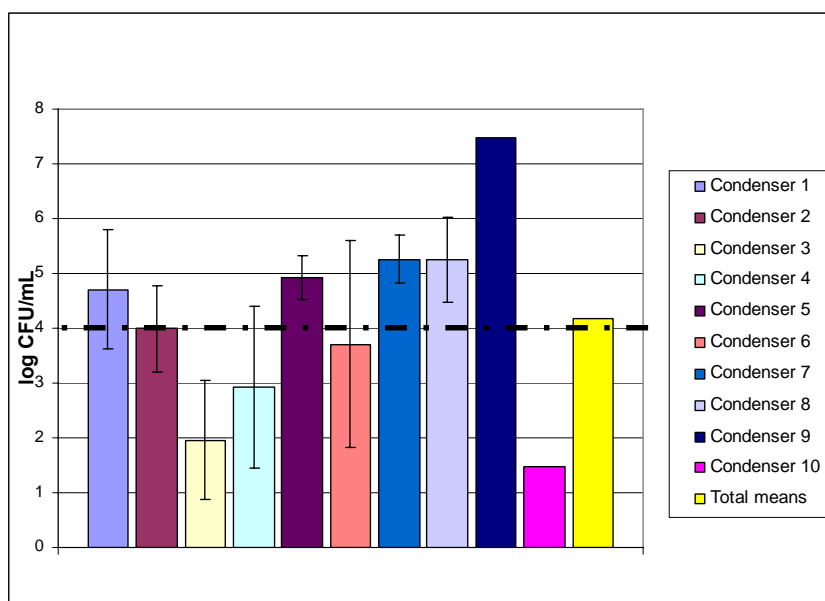


Figura 7. Evolución del número de microorganismos aerobios en el agua de los condensadores. (Media de los valores; las barras de error significan la desviación estándar).

Las líneas de trazos discontinuos son los límites de los valores permisibles.

Los equipos evaporativos mostraban la presencia de protozoos en todas las instalaciones investigadas.

Los protozoos son microorganismos resistentes a los biocidas (McCoy, 1998), y además las amebas presentes en el agua de los equipos evaporativos tratados con bactericidas son más

resistentes que las que se encuentran en otros hábitats (Srikanthl, 1994). Como se sabe, *Legionella* puede multiplicarse intracelularmente dentro de protozoos (Vandenesch *et al.* 1990). Esta problemática está presente en todas las instalaciones que hemos estudiado y demuestra en parte el alto riesgo de aparición de *Legionella pneumophila* en los condensadores evaporativos y dispositivos análogos.

Legionella pneumophila se detectó en algunas de las instalaciones, asociado en todos los casos a la presencia de amebas o de otros protozoos que pueden ser simbioses con la bacteria. Además se detectó la presencia de algas que pueden promover el crecimiento de *Legionella* (Lee y West 1991).

Recuentos de aerobios totales inferiores a 10^4 UFC/ml no aseguran que no exista riesgo de *Legionella*. En aguas de condensadores que presentaban estos valores aconsejables de microorganismos se encontraron colonias sospechosas de pertenecer al género *Legionella*, ya que el cultivo en placas de medios selectivos GVPC mostraba el crecimiento de colonias características de *Legionella spp.*

Por otro lado un recuento elevado de aerobios no está necesariamente ligado a la presencia del patógeno en el agua. Las placas de medios de cultivo selectivos han llegado a no presentar casi crecimiento en muestras de aguas en las que se daba un recuento de aerobios muy elevado.

El crecimiento en placa de colonias sospechosas de *Legionella* no siempre se ratificó con los test comerciales presentes en el mercado cuyo espectro de análisis está limitado, pero la aparición de estas colonias siempre estuvo ligada a la presencia de amebas y a una mala calidad del agua, reflejo del mal estado higiénico de los equipos.

El control de estos equipos es realizado por empresas de mantenimiento sanitario que, a la vista del estudio, deben mejorar la calidad de los servicios que prestan. Problemas como el mal uso de los productos químicos, los fallos de los sistemas de dosificación, una limpieza del equipo inadecuada, o análisis de aguas poco certeros deben ser solucionados.

4. CONCLUSIONES

Los análisis físico-químicos realizados, han mostrado que el agua de las instalaciones no cumple con los requisitos establecidos de limpieza y desinfección.

Se ha detectado la presencia de protozoos y algas en todas las instalaciones muestreadas.

Los recuentos de aerobios mesófilos han superado 10^4 UFC/ml en dos terceras partes de los análisis realizados. No obstante, no se ha encontrado una correlación entre la presencia de *Legionella* y el número de aerobios mesófilos.

Los análisis mostraron como a pesar de que todas las instalaciones estaban sometidas a un tratamiento preventivo de desinfección y limpieza contra *Legionella*, aparecieron casos de presencia de *Legionella pneumophila*.

Los equipos actuales no presentan un diseño higiénico, y esto se suma a la ineficacia del método de limpieza utilizado. El diseño higiénico de los condensadores debe realizarse en base a un sólido conocimiento de microbiología, ingeniería de procesos y mecánica, adoptándose éste en la fase inicial de desarrollo y concepción del equipo.

Las buenas prácticas en la ingeniería de diseño y en el mantenimiento de los equipos conseguirán controlar el patógeno y evitar la transmisión de la enfermedad.

5. REFERENCIAS

1. Bentham R. H. 2000. Routine Sampling and the Control of *Legionella* spp. in Cooling Tower Water Systems. *Current Microbiology*. 41, 271:275.
2. Devos, L., N. Boon, and Verstraete W. 2005, *Legionella pneumophila* in the environment: occurrence of a fastidious bacterium in oligotrophic conditions. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4:61-74.
3. EHEDG, 2002, *The prevention and control of Legionella spp (incl Legionnaire's Disease) in Food Factories*, Doc. 24, 24p.
4. Fields B. S. 1996, The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 4, 286:290.
5. James BW, Mauchline WS, Fitzgeorge RB, Dennis PJ & Keevil CW. 1995, Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63: 4224–4230.
6. Kramer MH, Ford TE. 1994. Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 195(5-6):470-482.
7. Lee JV, West AA. 1991, Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 20:121S-129S.
8. Liles MR, Scheel TA & Cianciotto NP. 2000, Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 182: 749–757.
9. McCoy, W. F. 1998, Imitating natural microbial fouling control. *Mater. Performance* 37:45–48.
10. Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. 2001, Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, 147, 3121-3126.
11. Reeves MW, Pine L, Neilands JB & Balows A. 1983. Absence of siderophore activity in *Legionella* species grown in irondeficient media. *J. Bacteriol.* 154: 324–329.
12. Srikanth S. Berk S.G. 1994, Adaptation of amoebae to cooling tower biocides. *Journal Microbial Ecology.* 27, 293:301.
13. Stout JE, Yu VL and Best MG. 1985, Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:221-228.
14. Vandenesch F, Surgot M, Bornstein N, Paucod JC, Marmet D, Isoard P, Fleurette J. 1990, Relationship between free amoeba and *Legionella*: studies in vitro and in vivo. *Zentralbl Bakteriolog.* 272(3):265-275.