Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

AGUAS MINEROMEDICINALES EXTREMADAMENTE DURAS: SALUD Y DIVERSIDAD MICROBIANA

Autor: Marta Valero Domínguez

Tutor: Carmina Rodríguez Fernández

Convocatoria: Junio 2016

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Resumen

Se ha estudiado comparativamente la diversidad microbiana y las principales características físico-químicas de 9 balnearios y 13 manantiales españoles, de aguas mineromedicinales clasificadas como *extremadamente duras*, utilizadas en tratamientos terapéuticos y balneoterapia. Se ha llevado a cabo recopilando y analizando los datos procedentes de los trabajos pluridisciplinares realizados por la Comisión de Aguas Mineromedicinales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Los manantiales no contienen microorganismos patógenos ni indicadores de contaminación fecal, por lo que desde un punto de vista sanitario, cumplen la normativa microbiológica para aguas de consumo humano y de bebida envasadas. Estos manantiales tienen una gran diversidad microbiana, predominando los bacilos y cocos Gram positivos de los Phyla *Firmicutes* y *Actinobacteria* y bacilos Gram negativos del Phylum *Proteobacteria*. Las poblaciones microbianas son predominantemente mesófilas y oligotrofas, que se adaptan a las condiciones de extrema dureza de las aguas. Las principales actividades metabólicas de las bacterias autóctonas son proteolíticas, amilolíticas y amonificantes. Los géneros más frecuentes encontrados en los manantiales son *Bacillus*(91,7%), *Pseudomonas* y *Staphlococcus*(83%), *Micrococcus* (66,7%) y en menor frecuencia *Cellulomonas*y *Arthrobacter*(50%). El conocimiento y estudio de la microbiota autóctona de estas aguas es importante por su valor ecológico y científico.

Palabras clave: Manantiales mineromedicinales. Aguas extremadamente duras. Balneoterapia. Biodiversidad.

1. Introducción y objetivos

El **objetivo** de este trabajo es analizar comparativamente la diversidad microbiana y las características físico-químicas de las aguas mineromedicinales *extremadamente duras*[(1)], de 9 Balnearios españoles y 13 manantiales estudiados en los últimos 25 años y utilizadas en diversos tratamientos terapéuticos.

Desde un punto de vista ecológico, es importante conocer dicha diversidad y caracterizar los factores que la determinan, cómo está organizada en la comunidad microbiana y qué valor tiene para la estructura y función de toda la comunidad

Cabe destacar que una de las características comunes de los balnearios elegidos es la elevada concentración en sales de sus aguas, y su extrema dureza. Las aguas se pueden clasificar en función de la cantidad de carbonato cálcico ($CaCO_3$), el principal parámetro empleado para determinar la dureza (*Tabla1*).

	Muy blanda	Blanda	Duras	Muy duras	Extremadamente duras
[$CaCO_3$] mg/L	≤ 100mg/L	100-200mg/L	200-300mg/L	300-400mg/L	> 400mg/L

*Tabla 1.*Clasificación de la dureza de las aguas mineromedicinales [(1)].

La totalidad de los manantiales estudiados superan los 400 mg/L de $CaCO_3$, por lo que se clasifican como de aguas **extremadamente duras.** Es importante señalar que la biodiversidad de los microorganismos presentes en los ambientes acuáticos depende de la composición y características físico-químicas de los mismos. De ahí el interés del estudio realizado, especialmente en ambientes extremos, en los que los microorganismos no sólo participan en los distintos ciclos biogeoquímicos de la naturaleza, sino que pueden presentar actividades metabólicas particulares con aplicaciones en biorremediación, ecología, industria y en la salud humana.

Uno de los factores determinantes para la vida en estos hábitats es la temperatura. Si bien todos los manantiales incluidos en este trabajo son de aguas *extremadamente duras*, difieren en la temperatura de emergencia de sus aguas, clasificándose como: hipertermales (>37 ºC), mesotermales (35-37 ºC) e hipotermales (< 35 ºC). [(1)]

Las aguas mineromedicinales de los balnearios termales presentan una gran **biodiversidad** de microorganismos autóctonos característicos de cada tipo de agua y de cada ambiente. Así mismo, también pueden encontrarse alóctonos, procedentes de otros hábitats como suelos, heces, vegetación, etc. Estos coexisten con los anteriores adaptándose a las condiciones adversas, pero algunos de ellos tienen un especial interés sanitario como *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* o *Salmonella*, muchos de ellos son indicadores de contaminación fecal por lo que han de controlarse rutinariamente. A fin de evitar la contaminación de las aguas minerales, es de suma importancia la adecuada canalización y la protección de los puntos de emergencia.

Finalmente se deben destacar las numerosas **propiedades** que se les atribuyen a dichas aguas y por lo que son de utilidad en balneoterapia. Sus particulares características físico-químicas (sales o pH), permiten su empleo por **vía oral**. Entre la gran variedad de efectos posibles, merecen especial mención las acciones reguladoras del equilibrio neuro-vegetativo y su acción beneficiosa sobre el sistema inmunitario. Además se han obtenido buenos resultados en el aparato digestivo, tanto a nivel estomacal como hepático; así como la acción diurética e incluso preventiva en la formación de cálculos propio de aguas de pH elevado que evita la precipitación de uratos.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Otra de las alternativas de uso de estas aguas es por **vía inhalatoria**, *aerosolterapia*, muy eficaz para alteraciones en el aparato respiratorio tales como bronquitis, asma, tos, rinitis, faringitis, etc.

Si se utiliza la **vía tópica**, son importantes las características propiamente físicas del agua, como la fuerza mecánica y la temperatura (Ej., activación de la circulación periférica por acción térmica. Estas son habituales en forma de baños (*Fig. 1*), duchas o chorros y pueden actuar tanto a nivel local como general.

Figura 1. Detalle bañera balneario Cervantes

2. Metodología

En este trabajo se harecopilado y analizado de forma comparativa todos los datos publicados en los estudios pluridisciplinares de la Comisión de Aguas Mineromedicinales de la Real Academia Nacional de Farmacia, durante los últimos 25 años.Estos estudios consisten en un detallado análisis multidisciplinar tanto de la composición físico-química, radiactiva y microbiológica de las aguas mineromedicinales de los Balnearios españoles, como de sus aplicaciones, historia y entorno.

Los Balnearios estudiados han sido:

- Balneario de Alicún de las Torres (Granada). Manantial *Baños.*
- Balneario de los *Baños de Arnedillo* (Zaragoza).
- Balneario Baños de Fitero (Navarra). Manantiales *Béquer* y *Palafox*.
- Balneario Cervantes (Ciudad Real). Manantiales *San Camilo* y *Cervantes*.
- Balneario El Paraiso de Manzanera (Teruel). Manantial *El Salvador*.
- Balneario de *Hervideros de Cofrentes*(Valencia).
- Balneario de la Toja (Pontevedra). Pozos *Mar*, *Capilla* y *Puerta*.
- Balneario de *Puente Viesgo* (Cantabria).
- Balneario de *Carabaña* (Madrid).

- ✓ El análisis comparativo, el tratamiento de los datos y la elaboración de las gráficas se hizo mediante la herramienta de Microsoft Excel.
- ✓ Para la escritura técnica de números, magnitudes y unidades se han seguido las normas ISO del *Sistema Internacional de Unidades*, publicadas en el Boletín Oficial del Estado y de uso obligatorio en cualquier documentación oficial[(2)]
- ✓ Todas las tablas y figuras de esta memoria son originales (M. Valero) y fueron elaboradas a partir de los análisis realizados en esta memoria.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

3. Resultados y discusión

3.1. Características físico-químicas

3.1.1. Dureza

La característica común de los manantiales estudiados es que son de aguas *extremamente duras*, (400 mg/L $CaCO_3$) excepto Puente Viesgo[3]clasificado como*aguas muy duras*(*Fig 2*).Destacan Carabaña[4]y Hervideros de Cofrentes[5]superando los 4 000 mg/L, La Toja[6] más de 3 000 mg/L y Baños de Fitero[7]El Paraíso[8], Arnedillo[9], Alicún[10]y Cervantes[11]entre 1 300-2 000 mg/L.

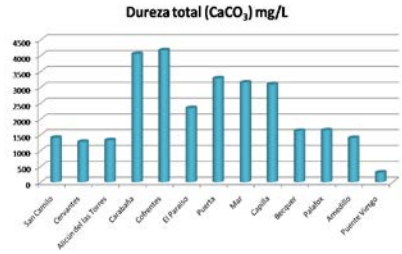

Figura 2.Dureza total de los manantiales

3.1.2.Temperatura

La temperatura del agua de los manantiales en el punto de emergencia de la mayoría de los estudiadoseshipertermal: Cervantes[11],La Toja[6], Baños de Fitero[7], Arnedillo[9] y Carabaña[4](36,4-48,5 ºC). Solo cuatro de los manantialesson hipotermales:San Camilo[11], Alicún[10], Cofrentes[5], El Paraíso[8] (17-34 ºC) (*Fig. 3*).

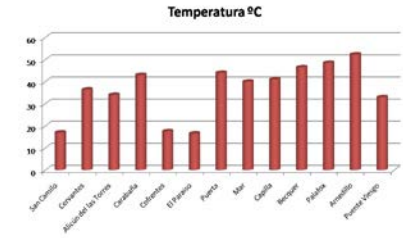

Figura 3. Temperatura de emergencia de los manantiales

3.1.3. Hierro

Los manantiales con mayor contenido en hierro son La Toja[6] (7 600-8 100 µg/L) y Hervideros de Cofrentes[5](7 500 µg/L). En cambio Baños de Fitero[7] (300 µg/L) y El Paraíso[8] (44 µg/L) presentan menor contenido. Es sorprendente que los dos manantiales del balneario de Cervantes[11] solo se diferencien en la temperatura y en la concentración de hierro: San Camilo (17 ºC; 67,5 µg/L hierro) y Cervantes (36,4 ºC; 2 423 µg/L hierro) (*Fig. 4*).

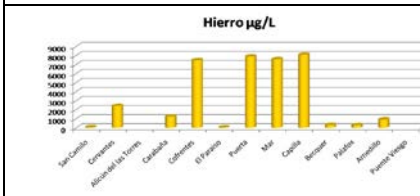

Figura 4.Concentración de hierro de los manantiales

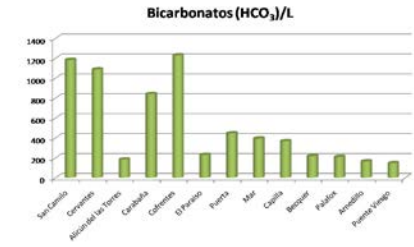

Figura 5.Concentración de bicarbonato de los manantiales

3.1.4. Bicarbonatos y sulfatos

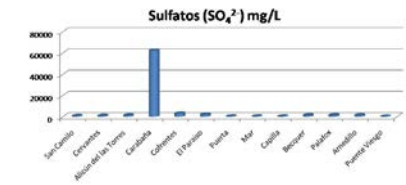

Figura 6. Concentración de sulfatos de los manantiales

Los únicos manantialesclasificados oficialmente como bicarbonatados son Cervantes[11] y Hervideros de Cofrentes[5] con más de 1 000 mg HCO_3/L. Únicamente el de Carabaña[4] destaca por su elevado contenido en sulfatos (>6 000 mg/L SO_4^{2-}) (*Figs. 5y6*)

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

3.1.5. Cloruros y sodio

Los niveles de cloruros son muy elevados en los tres manantiales del balneario de La Toja[6] (Puerta, Mar y Capilla; 16 000 mg/L) y elevados en Carabaña[4], El Paraiso[8]y Arnedillo[9] (3 000-4 000 mg/L) y Palafox (1 500 mg/L) (*Figs. 7y8*).

El mayor contenido en sodio lo presentan Carabaña[4] (3 0008 mg/L), La Toja[6] (8 592-8 943 mg/L), Arnedillo[9] y El Paraíso[8] (2 093-2 852 mg/L).

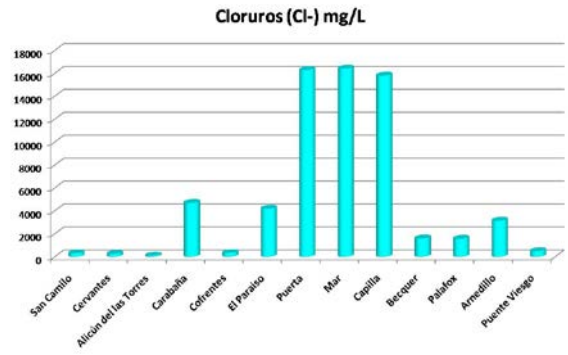

Figura 7. Concentración de cloruros de los manantiales

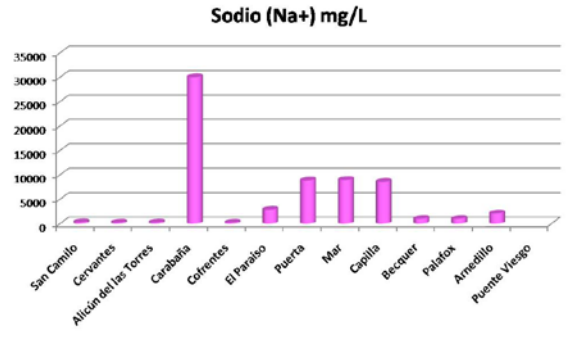

Figura 8. Concentración de sodio de los manantiales

3.2. Microorganismos totales y viables (UFC/ml)

Una de las principales dificultades encontradas en este estudio comparativo ha sido el cambio en los métodos empleados para el recuento de microorganismos desde hace 30 años al día de hoy. Actualmente el método más empleado[12] para este recuentoes la epifluorescencia (las muestras se tiñen con naranja de acridina 0,1%,se filtran, se lavan y se con objetivo de inmersión (100x) en un microscopio de epifluorescencia).Alternativamente se puede utilizar la citometría de flujo (tinción con isocianato de fluoresceína 50µm/ml y yoduro de propidio 0,005%; que tiñen respectivamente las células vivas y muertas). Este cambio en la metodología empleada, ha limitado la interpretación de los datos de los que se dispone y las conclusiones finales. Por este motivo no se han incluido los resultados obtenidos en los balnearios de Arnedillo y Carabaña.

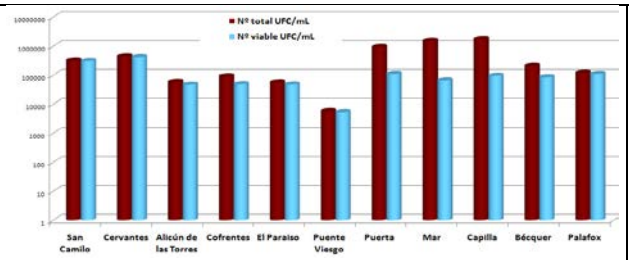

Figura 9. a) Número de microorganismos totales y viables UFC/ml de los manantiales (escala logarítmica)

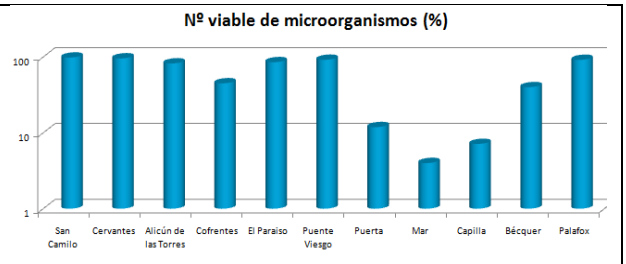

Figura 9. b) Número de microorganismos viables UFC/ml de los manantiales (escala logarítmica)

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

En general, el número de microorganismos viables es notablemente alto. No obstante, en los manantiales de **La Toja**[13],se obtiene un número total de microorganismos muy elevado ($9,2x10^5$-$1,7x10^6$ UFC/ml)y con el menor porcentaje de viables (Puerta 11,9 %, Mar 4 % y Capilla 7,14 %) en comparación con los otros manantiales (82-98 %).Esto quizás sea debido a las altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, condiciones que limitan el crecimiento.

El Balneario **Cervantes**[14] presenta un número alto de microorganismos totales (3,2-4,4x 10^5UFC/ml)siendo más elevada su viabilidad (San Camilo 98,3 %, Cervantes 95,9 %), quizás por las condiciones medioambientales de crecimiento más favorables.

No en todos los puntos de emergencia de un mismo balneario, los microorganismos tienen la misma viabilidad. Así por ejemplo, en Baños de **Fitero**[15], en el manantial Bécquer apenas es viable un 40 %, en cambio en Palafox casi el 92 % de los microorganismos lo son.

En el resto de los balnearios estudiados se detecta menor número total de microorganismos ($5,6$-$9,1x10^4$ UFC/ml), pero mantienen un porcentaje elevado de vivos (80-90 %).

Debe tenerse en cuenta que el método empleado para determinar la viabilidad celular bacteriana, condiciona los resultados. Es decir, la tinción por epifluorescencia es muy sensible y detecta la viabilidad *in situ* en la muestra. En cambio, los métodos de cultivo introducen algunas limitaciones. Así la mayor o menor selectividad de los medios y las condiciones de incubación usadas para el crecimiento de los microorganismos, hace que solo los fácilmente cultivables se recuperen en el laboratorio. No debe olvidarse que en los ecosistemas acuáticos naturales también se encuentran microorganismos “viables no cultivables” o “difícilmente cultivables”.

3.3. Bacterias aerobias viables heterotrofas y oligotrofas

El método más habitual para realizar el recuento de las bacterias viables heterotrofas[16] y oligotrofas[17] es mediante siembra por dilución en placa en dos medios diferentes:

- Agar recuento en placa (PCA) para bacterias heterótrofas
- Agar R_2A para bacterias oligotrofas

Se incuban a diferentes temperaturas (22 ^oC durante 5 días, 37 ^oCy45 ^oC durante 48h). Sólo en un balneario se obtuvo crecimiento a 45 ^oC (La Toja), por lo que se comparan los resultados a 22 ^oC y 37 ^oC.

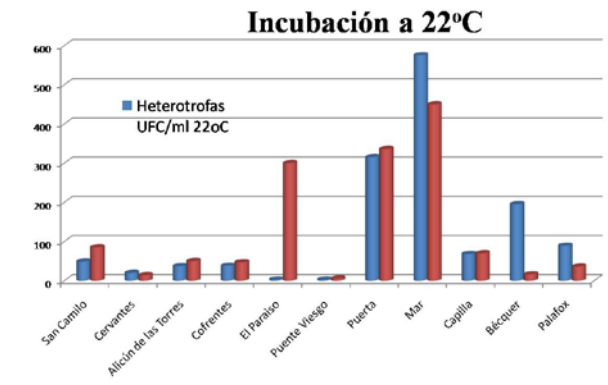

Figura 10. a). Bacterias viables heterotrofas y oligotrofas a 22ºC

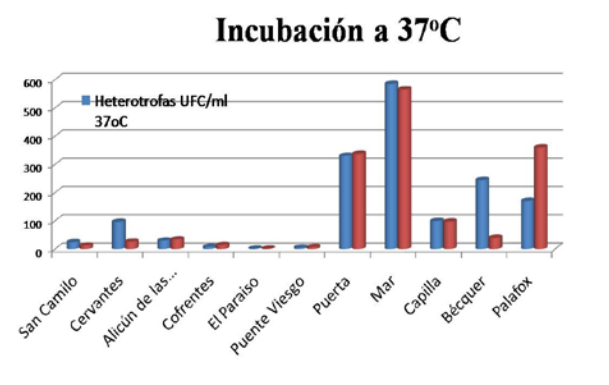

Figura 10. b) Bacterias viables heterotrofas y oligotrofas a 37ºC

En los dos manantiales del balneario **Cervantes**[14]el número de bacterias heterotrofas y oligotróficas aerobias viables fue inferior a 100 UFC/ml. No se observaron apenas diferencias entre los distintos medios de cultivo y temperaturas de incubación, debido a que en los ecosistemas subterráneos predominan las bacterias oligotróficas facultativas capaces de adaptarse a distintas concentraciones de sustratos orgánicos.

En **Alicún de las Torres**[12]el número de bacterias heterotrofas y oligotróficas fue inferior a 100 UFC/ml, lo que significa que la protección de los manantiales es adecuada. Presentan más bacterias oligotrofas que heterotrofas, propio de las aguas subterráneas donde predominan las bacterias que viven a concentraciones muy bajas de compuestos orgánicos.

En los balnearios de **Cofrentes**[18] y **Puente Viesgo**[19], al igual que los anteriores el número de bacterias viables ha sido bajo a ambas temperaturas, algo superior a 22ºC, confirmando así la buena protección de los manantiales. El recuento fue más alto en el medioR_2A, como anteriormente. El crecimiento a 45 ºC es insignificante; todo esto indica que la población autóctona de estas aguas es mesófila y oligotrófica.

En **El Paraíso**[20], cabe destacar la detección de crecimiento abundante de oligotrofas a 22 ºC (300 UFC/ml)que no se encuentran a 37 ºC, lo que indica que son autóctonas del agua y pueden contribuir a la autodepuración del manantial.

Finalmente en los manantiales de **La Toja**[13] tanto el número de heterotrófas como el de oligotrofas fue similar a 22ºC y 37ºC(337 UFC/ml)y muy bajo a 45ºC(38 UFC/ml). En Baños de **Fitero**[15]**,**en el manantial de Bécquer (360 UFC/ml)se observa mayor crecimiento de oligotróficas que en Palafox a 37 ºC (40 UFC/ml). La baja presencia de especies alóctonas indica la buena protección de los puntos de emergencia.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

3.4. Tipos morfológicos y clasificación taxonómica

Las cepas aisladas en los distintos medios de recuento, se reaislaron eidentificaronsegún sus las características morfológicas (tinción de Gram y esporas), fisiológicas (tipo respiratorio, producción de pigmentos) y bioquímicas (oxidasa, catalasa, oxidación-fermentación de la glucosa, reducción de nitratos y movilidad)[(21)]. Además se utilizó el sistema de identificación por pruebas bioquímicas miniaturizadas de galerías API®(bioMérieux), para los bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores; las galerías Coryne para los bacilos Gram positivos no esporulados y las galerías Staph para los cocos Gram positivos. La clasificación se realizó según los criterios taxonómicos del Manual de Bergey[(22)].

Las aguas hipertermales de La **Toja**[(13)] presentan mayor proporción de bacterias Gram positivas de los *Phyla Firmicutes* y *Actinobacteria*, debido a que estas son más resistentes a las altas temperaturas y a mayor concentración de sales. En cambio, en los hipotermales predominan los bacilos Gram negativos del *Phylum Proteobacteria* (*Figs. 11* y *12*).

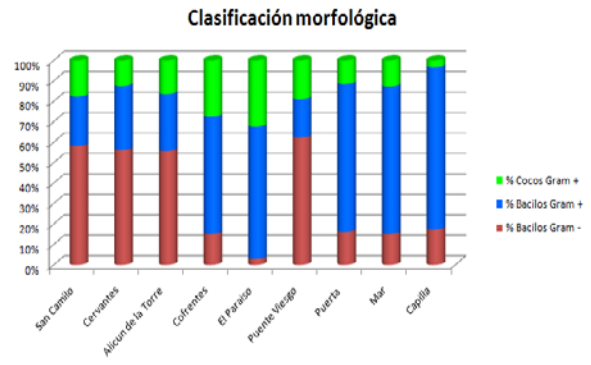

Figura 11. Clasificación morfológica de las bacterias de los manantiales

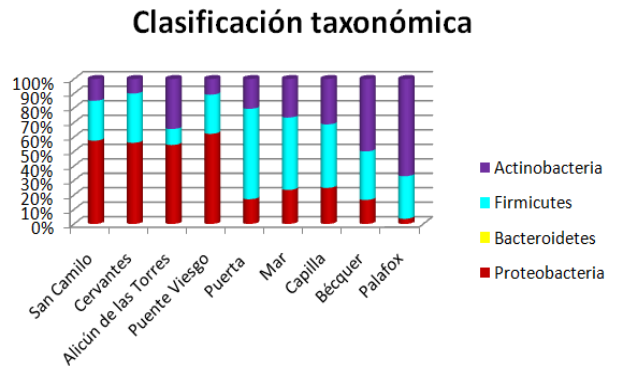

Figura 12. Clasificación taxonómica de las bacterias de los manantiales

En **Alicún de las Torre**[(12)]predominan los bacilos Gram negativos (55,6 %), seguidos de los Gram positivos (28 %) y finalmente cocos Gram positivos (16,4 %). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey[(22)] las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría al *Phylum Proteobacteria*, clase *Gamma* (54,5 %), y en menorproporción, a los *Phyla: Actinobacteria* (34,5 %) y *Firmicutes* (11 %)(*Figs. 11* y *12*).

En el balneario de **Cervantes**[(14)], entre los dos manantiales se han descrito 75 cepas de bacterias heterotrofas de las cuales se han identificado 71 cepas que corresponden a: bacilos Gram negativos 42 cepas (56,0 %), bacilos Gram positivos 18 cepas (24,0 %) y cocos Gram positivos 11cepas (14,6 %). En ambos predominan los bacilos Gram negativos, encontrándose especies fermentadoras y no fermentadoras, lo que es característico de aguas minerales

hipotermales. El manantial San Camilo tiene una gran biodiversidad presentando un número mayor de especies diferentes que el manantial Cervantes.

Del Hervideros de **Cofrentes**[18]se han aislado 40 cepas que corresponden a bacilos Gram positivos, 23 cepas; cocos Gram positivos,11cepas;y bacilos Gram negativos, 6cepas. El predominio de las Gram positivas respecto a las Gram negativas podría deberse a las características físico-químicas específicas del manantial, como pH elevado, alta concentracion de anhidrido carbónico y otros componentes químicos.

En El **Paraísode Manzanera**[20], igual que en otros hipotermales, predominan bacilos Gram positivos (64,7%), seguidos de cocos Gram positivos (32,3 % y 14,3 %). En el Paraíso solo se ha detectado una cepa de bacilos Gram negativos. La mayoría de los bacilos Gram negativos aislados son no-fermentadores (82,8 %) y pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*.

Análogamente en **Puente Viesgo**[19] predominan bacilos Gram negativos no-fermentadores (62,2 %), bacilos y cocos Gram positivos (18,9 %) y los grupos taxonómicos de: *Proteobacteria (Alfa*, *Beta* y *Gamma)* (62,2 %),*Firmicutes*(27 %) y *Actinobacteria*(10,8 %).

En **La Toja**[13]se observa mayoría de bacilos Gram positivos del Phylum *Firmicutes*,respecto a otros tipos de bacterias. Seguidos de bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. Es de destacar que el pozo hipotermal presenta mayor proporción de bacilos Gram negativos que el mesotermal.

Por último, Baños de **Fitero**[15]en el que se han aislado con mayor frecuencia -en todas las muestras- bacilos Gram positivos, seguidos de cocos Gram positivos y en último lugar de bacilos Gram negativos. Estos últimos se encuentran principalmente en las aguas de bebida. Resulta sorprendente, en comparación con el resto de los manantiales estudiados, que la micropoblación mayoritaria de estas aguas sean bacterias Gram positivas y no Gram negativas, que en general suelen ser más frecuentes el las aguas mineromedicinales.

3.5. Microorganismos de interés sanitario

La utilización con fines terapéuticos de las aguas mineromedicinales en los balnearios no debe constituir ningún riesgo sanitario,por lo que tienen que estar exentas de bacterias que indiquen contaminaciónfecal y de microorganismos patógenos que puedan transmitirse por el agua, a través de la vía oral, respiratoria o tópica.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Para ello se han realizado los recuentos de *Escherichia coli*, coliformes totales, coliformes fecales, enterococos, esporas de *Clostridium* sulfito-reductores y *C. perfringens* en 100 ml y en 250 ml de agua. Además se ha investigado la presencia de bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella y Legionella* en 250 mL de agua. Ninguno de los manantiales presenta indicadores fecales ni bacterias patógenas, según la Normativa española vigente para aguas de consumo humano[23] y de aguas de bebida envasadas[24, 25]

Cabe destacar que en el balneario de **La Toja**[13], se detectó un elevado número de coliformes totales identificados como *Enterobacter* y de esporas de clostridios sulfitorreductores, esto hace que el agua sea considerada no potable. Pero esta presencia no significa específicamente contaminación fecal ya que pueden encontrarse de forma normal en el suelo y pasar al agua. Esta situación podría indicar la falta de eficacia de la filtración natural o contaminación con el suelo, lo que significaría la escasa protección de los manantiales. Aunque existe la posibilidad de que provengan de contaminación fecal antigua debida a animales, ya que estas bacterias son muy resistentes a las condiciones desfavorables.

En algunos de los manantiales estudiados, como en **Palafox**[15], se ha detectado *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria es común y puede encontrarse en suelos y en aguas superficiales contaminadas con aguas residuales. Es un patógeno oportunista[26] clínicamente significativo, especialmente en el caso de personas inmunodeprimidas. Cuando no existen otras bacterias patógenas, la presencia de *Pseudomonas* puede ser debida a contaminación transitoria por suelo o filtraciones de agua, teniéndose que adoptar medidas higiénico-sanitarias posteriores así como de protección del punto de emergencia, a fin de eliminar y controlar dicha contaminación.

Por tanto, la normativa española no permite la presencia de *P. aeruginosa* en aguas de bebida envasadas[24,25] ni en minerales naturales (manantiales).Esta bacteria es capaz de vivir con escasos nutrientes y a temperaturas de 42 ºC, lo que hace posible su supervivencia en estas aguas. De ahí la importancia de la desinfección de arquetas y canalizaciones, así como el correcto aislamiento de la captación para evitar filtraciones.

3.6. Microorganismos de interés ecológico

Se ha determinado el número de bacterias queintervienen en el ciclo del carbono (proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas),del nitrógeno (amonificantes, nitrificantes) y del azufre(sulfato-reductoras). Se detectan por la técnica del número más probable (NMP), utilizando los medios descritos en Pochon y Tardieux[27] y el medio de Starkey[28] para las últimas, e incubando a 30 ºC, 15 días. Estos microorganismos son esenciales en los procesos

biogeoquímicosque ocurren en los sistemas hidrotermales, ya que poseen diversas capacidades metabólicas, transformando loscompuestos orgánicos en inorgánicos y manteniendo el equilibriobiológico del hábitat.

En la mayoría de los balnearios abundan las bacterias proteolíticas (*Fig. 13*) y amonificantes (*Fig. 14*), principalmente *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp*. En cambio, las nitrificantes (*Fig. 15*) son las que menor presencia tienen.

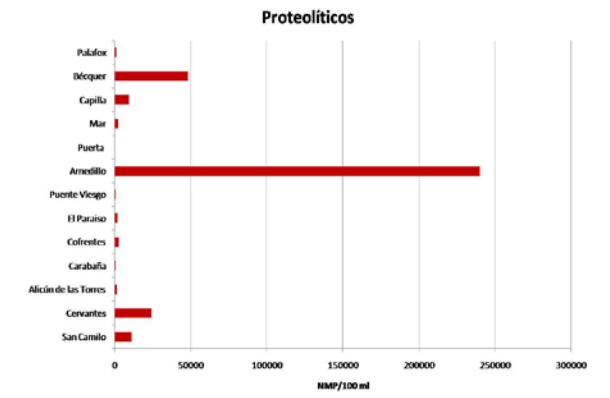

Figura 13. Bacterias proteolíticas (NMP/100mL) de los manantiales

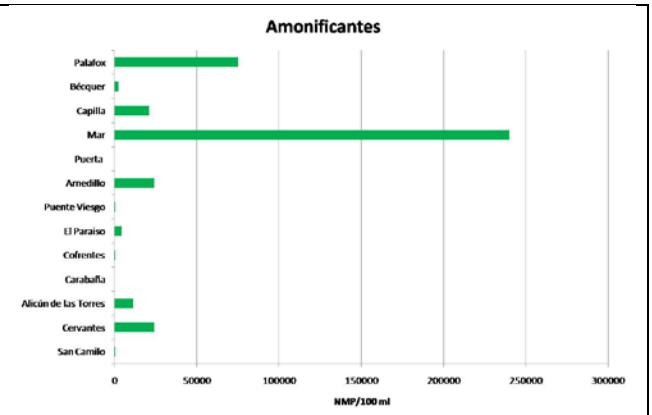

Figura 14. Bacterias amonificantes (NMP/100mL) de los manantiales

En el balneario de **Alicún de las Torres**[12] predominan las proteolíticas ($1{,}1.10^3$ NMP/100ml), amilolíticas (460 NMP/100ml) y amonificantes ($1{,}1.10^4$ NMP/100ml); no se han encontrado sulfato-reductoras a pesar de que estas aguas posean una elevada concentración de sulfatos. Esto se debe a que estas bacterias son anaerobias estrictas y no suelen encontrarse en la columna de agua sino en los sedimentos.

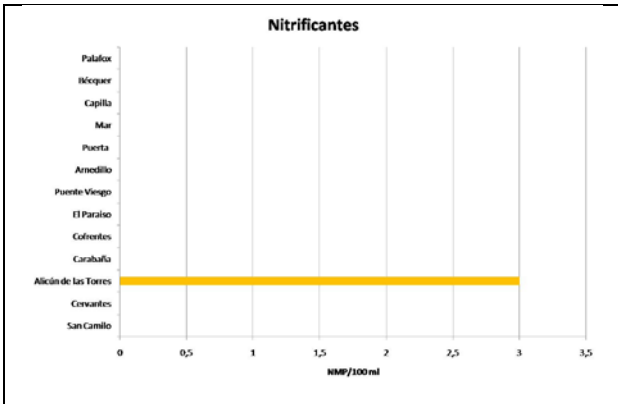

Figura 15. Bacterias nitrificantes (NMP/100mL) de los manantiales

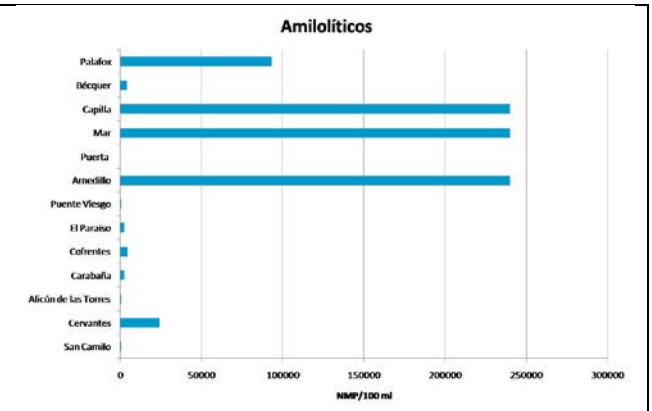

Figura 16. Bacterias amilolíticas (NMP/100mL) de los manantiales

En **Baños de Fitero**[15],mientras que en el manantial Bécquer destaca el número de bacterias proteolíticas ($4{,}8x10^4$ NMP/100ml), en el manantial Palafox predominan las

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

amilolíticas (9,3x10^{4}NMP/100ml) y amonificantes (7,5x10^{4}NMP/100ml). Al igual que el anterior, a pesar de que estas aguas poseen un elevado contenido en sulfatos (>1.300 mg/L), no se han detectado bacterias sulfato-reductoras; aunque es posible que existan, pero en un número demasiado pequeño para su detección.

De nuevo en **La Toja**[13], destacan el número de bacterias amonificantes (2,4.10^5-2,1.10^4 NMP/100ml)identificadas como *Bacillus spp.* y *Enterobacter*. También las amilolíticas (2,4.10^{5}NMP/100ml), principalmente *Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus, Cellulomonas*. En menor cantidad, se encuentran las proteolíticas (7,5.10^3 NMP/100ml).

El punto de emergencia del manantial de **Puente Viesgo**[19] presenta bacterias amonificantes y proteolíticas en número medio (460-750 NMP/100 ml), amilolíticas y celulolíticas (*Fig. 17*) en número bajo (21-3,6 NMP/100 ml) y ausencia de bacterias sulfato-reductoras y nitrificantes. Las bacterias proteolíticas aisladas pertenecen a las especies *Bacillus licheniformis, Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* y las bacterias amilolíticas a *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus licheniformis*. Las bacterias con actividad proteolítica y amilolítica están ampliamente distribuidas en los hábitats acuáticos. Las amonificantes aisladas fueron *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus spp*. Estas bacterias intervienen en el ciclo del nitrógeno en los sistemas acuáticos, degradando los compuestos orgánicos nitrogenados y han sido aisladas en otros manantiales mineromedicinales.

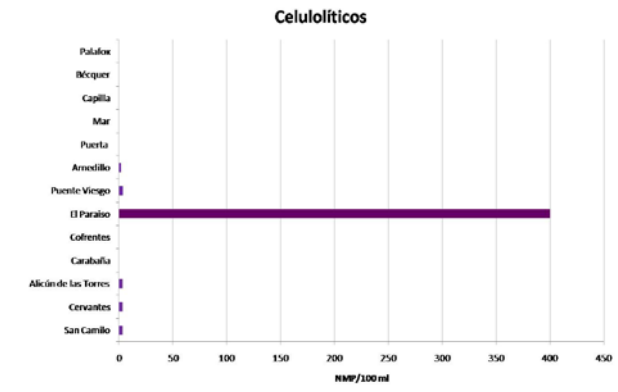

Figura 17. Bacterias celulolíticas (NMP/100mL) de los manantiales

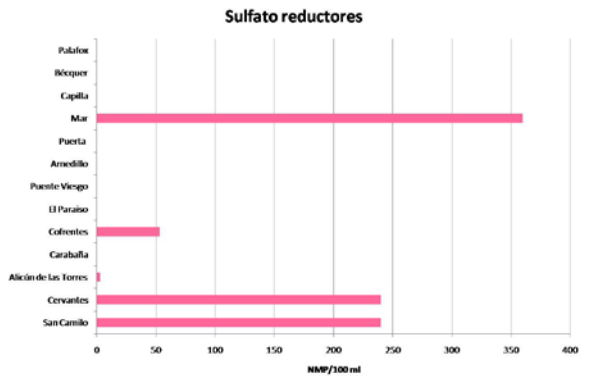

Figura 18. Bacterias sulfato-reductoras (NMP/100mL) de los manantiales

En el balneario **Cervantes**[14], en ambos manantiales se han detectado, aunque en menor nivel en San Camilo, bacterias proteolíticas(1,1x10^4- 2,4.10^4 NMP/100ml), amilolíticas(460-2,4.10^4 NMP/100ml) y amonificantes(3,6- 2,4.10^4 NMP/100ml). Además hay bacterias sulfato-reductoras (*Fig. 18*) en número medio (240 NMP/100ml) y celulolíticas en muy baja cantidad (<3 NMP/100ml). Las bacterias proteolíticas y amilolíticas aisladas de estos

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

manantiales pertenecen, principalmente, a los géneros *Burkholderia*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Bacillus.* Las amonificantes fueron *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. En ambos manantiales no se detectaron bacterias nitrificantes.

Las bacterias proteolíticas, amilolíticas y amonificantes ($2{,}1.10^4$-$2{,}4.10^5$NMP/100ml) que se han detectado en el manantial de **Arnedillo**[(29)]son muy abundantes en comparación con los otros manantiales estudiados.

En los balnearios de **Carabaña**[(30)], **Cofrentes**[(18)] y **El Paraíso**[(20)] predominan las proteolíticas (670-$2{,}4x10^3$ NMP/100 ml), y amilolíticas ($2{,}4$-$4{,}5x10^3$ NMP/100 ml). Este último presenta, además, bacterias amonificantes ($4x10^3$ NMP/100 ml) y celulolíticas (400 NMP/100 ml). Cabe destacar que en Cofrentes hay sulfato-reductoras en niveles bajos (53 NMP/100 ml).

3.7. Diversidad bacteriana

Se ha estudiado la diversidad bacteriana y la frecuencia con la que aparecen en los distintos manantiales los géneros y especies mas importantes. El género más frecuente es *Bacillus spp.* encontrado en un 91,7% de los manantiales estudiados, seguido de *Pseudomonas* y *Staphylococcus* presentes en el 83% de ellos. *Micrococcus* ha sido hallado en el 66,7%, y*Cellulomonas*, *Clostridium* y *Arthrobacter* en el 50% (*Fig. 19*).

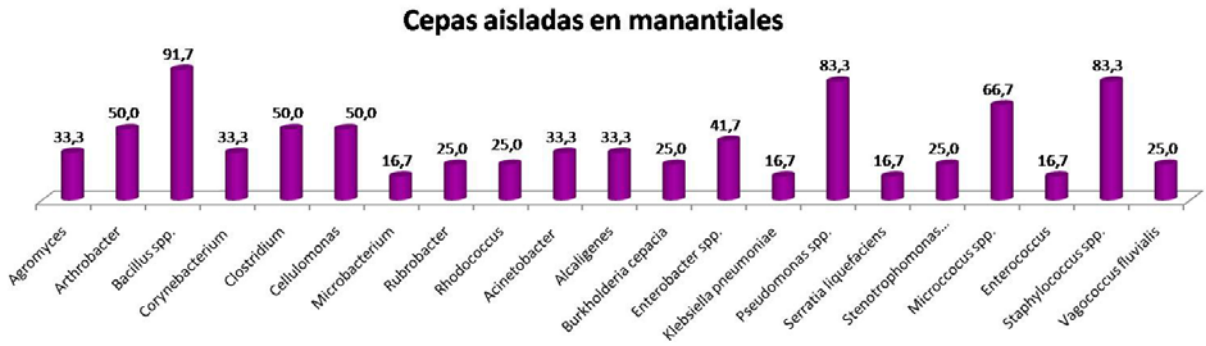

Figura 19. Porcentaje de manantiales en los que aparecenlos géneros y especies más frecuentes.

En el balneario de **Alicún de las Torres**[(12)]predominan las bacterias Gram negativas no fermentadoras, de la especie *Pseudomonas putida* (20%) seguidas de *Pseudomonas fluorescens* (12%). Las especies del género *Pseudomonas*,debido a sus escasos requerimientos nutricionales que lespermite sobrevivir y multiplicarse en ambientes oligotróficos, hansido encontradas en numerosos manantiales mineromedicinales. De las bacterias Gram negativas fermentadoras, destaca la especie*Aeromonas hydrophila*que es autóctona del agua. *Arthrobacter* y *Corynebacterium* (6,7-10%) proceden del suelo y se han encontradoen otros

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

manantiales mineromedicinales y mesotermales. *Rhodococcus* (10%) es muy resistente a los ambientes extremos ya que posee ácidos micólicos, y también se ha aislado en otros manantiales: Jaraba (hipotermal de aguas muy duras)[31], Cervantes[14]y Puente Viesgo[19]. Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden a los géneros *Staphylococcus* y *Kocuria*. (3-6,7%) (*Fig. 20)*.

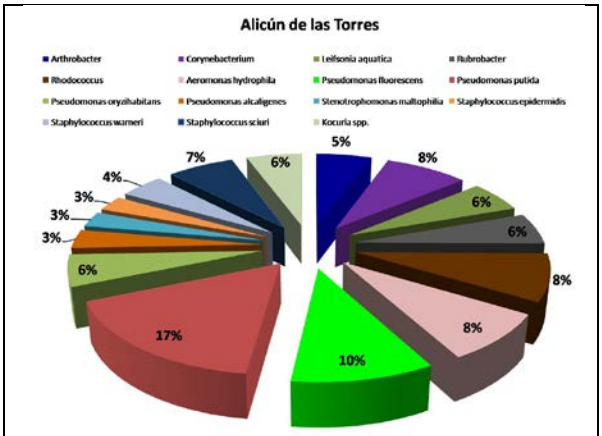

Figura 20 . Diversidad de géneros y especies del manantial de Alicún de las Torres

En el balneario **La Toja**[13], se han aislado 43 cepas en el manantial Puerta, 34cepas en Mar y 16cepas en Capilla. En los tres predomina *Bacillus spp.* (53,5%, 66,6%, 65,5%), seguido de *Micrococcus* (6,9%, 7,7%, 18,7%) y *Clostridium* (4,6%, 5,1%, 13%) (*Fig. 21)*.

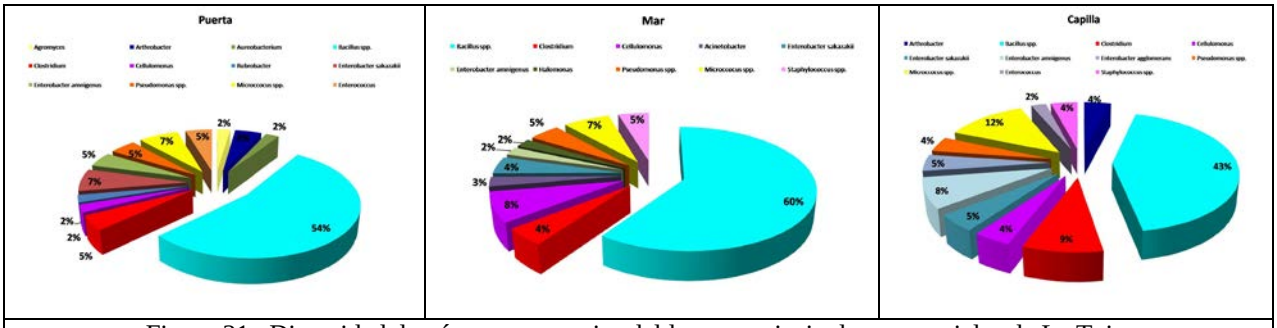

Figura 21 . Diversidad de géneros y especies del los tres principales manantiales de La Toja.

En **Baños de Fitero**[15], en ambos manantiales Bécquer y Palafox destaca la presencia mayoritaria de *Arthrobacter* (29% -30,7%) y *Bacillus spp.* (20,8%-18,5%). En Palafox abunda *Micrococcus* (22%) y *Xanthomonas* (10,3%). En ambos hay presencia de *Kurthia* (8,3%-7,4%) (*Fig. 22)*.

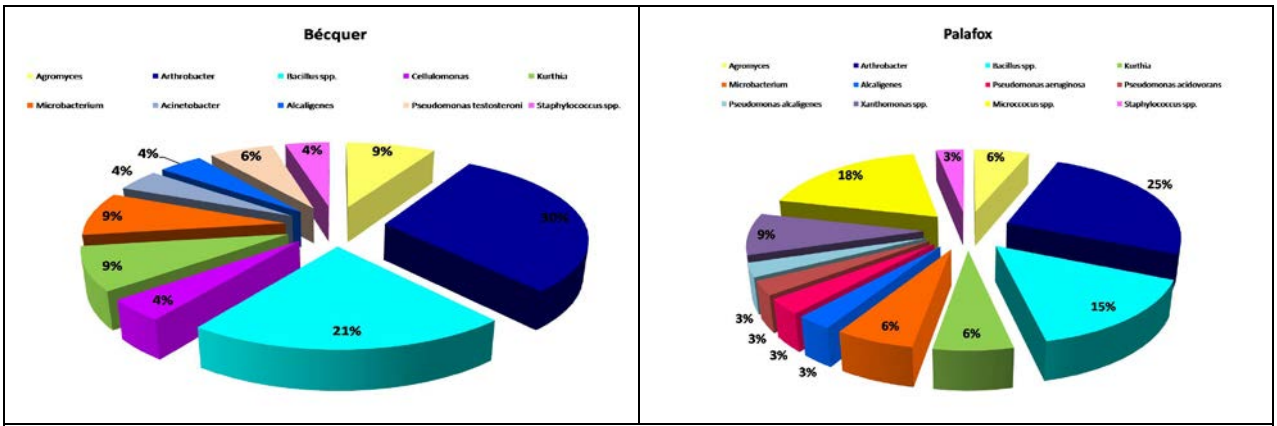

Figura 22 . Diversidad de géneros y especies del los dos principales manantiales de Baños de Fitero.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

En el balneario **Cervantes**[(14)] hay diferencias entre ambos manantiales(*Fig. 23)*, en San Camilo predomina *Aeromonas hydrophila* (12%) seguido de *Serratia marcescens* (10%), mientras que en Cervantes destaca *Burkholderia cepacia* (22,9%) seguida de *Clostridium spp.* (14,3%). En ambas hay *Bacillus, Corynebacterium, Staphylococcus xylosus* y *Pseudomonas fluorescens.*

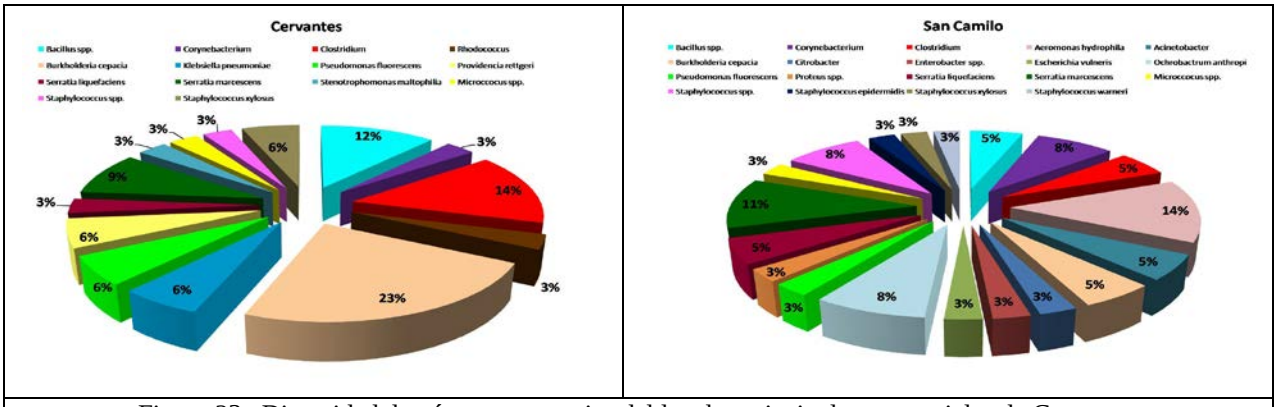

Figura 23 . Diversidad de géneros y especies del los dos principales manantiales de Cervantes

En **El Paraíso**[(20)]sobresalen *Paenibacillus polimyxa* (17,6%), *Bacillus circulans* (14,7%) y *Staphylococcus saprophyticus* (8,85) (*Fig. 24)*. En **Puente Viesgo**[(19)],*Pseudomonas alcaligenes* (16,3%), *P.stutzeri* y *Bacillus licheniformis* (13,5%)(*Fig. 25).*

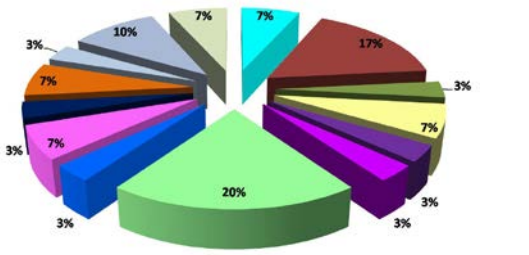

Figura 24. Diversidad de géneros y especies del manantial de El Paraiso

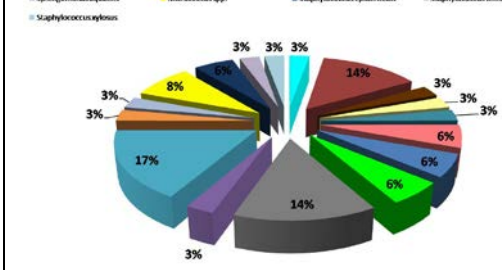

Figura 25. Diversidad de géneros y especies del manantial de Puente Viesgo

4. Conclusiones

- Los manantiales estudiados no contienen microorganismos patógenos ni indicadores de contaminación fecal, por lo que cumplen la normativa microbiológica para aguas de consumo humano y de bebida envasada. No obstante debe mantenerse el control sanitario y una correcta protección de los puntos de emergencia para evitar la contaminación por bacterias alóctonas.

- Las bacterias heterotrofas corresponden a bacilos y cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos.
- Los géneros más frecuentes son *Bacillus spp.*(91,7%), *Pseudomonas* y *Staphlococcus* (83%), *Micrococcus* (66,7%) y en menor frecuencia *Cellulomonas*, *Clostridium* y *Arthrobacter* (50%).
- Las poblaciones son predominantemente mesófilas y oligotrofas. Cuanto más extremas son las condiciones físico-químicas de las aguas, menor es el número de bacterias totales y viables; probablemente éstas últimas se encuentran en *estado de latencia viable no cultivable*.
- Las principales actividades metabólicas de las bacterias autóctonas son proteolíticas, amilolíticas y amonificantes. Estas comunidades desempeñan una función fundamental en los ciclos biogeoquímicos, transformando los compuestos orgánicos y contribuyendo a la autodepuración de las aguas.
- El conocimiento y estudio de la microbiota autóctona de las aguas mineromedicinales es importante por su valor ecológico y científico, ya que aún se desconocen muchos de los mecanismos de adaptación y resistencia a condiciones extremas.

5. Bibliografía

1. Instituto de Salud Carlos III, Universidad Complutense de Madrid. Vademécum de aguasmineromedicinales españolas. Madrid: Comunidad de Madrid, Instituto de Salud Carlos III. 2003; 52-53
2. Real Decreto 2032/2009. Resolución de 30 de diciembre por el que se establecen las unidades legales de medida. Boletín Oficial del Estado, 18 de febrero de 2010, núm. 43, sec. I, pp. 14880 (Anexo).
3. Torija Isasa ME, Orzáez Villanueva MT, García Mata M, Tenorio Sanz MD, López Colón JL. Análisis físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2007; Monografía nº28. 223-241.
4. Manuel López de Azcona JM. Consideraciones sobre el grupo de manantiales mineromedicinales de Carabaña. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1981; Monografía nº8. 5-17.
5. García Puertas M, García Mata M, Tenorio Sanz MD, Orzáez Villanueva MT. Análisis físico-químico del agua minero-medicinal del balneario “Hervideros de Cofrentes”. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1998; Monografía nº22. 25-42.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

6. García Puertas M, García Mata M, Tenorio Sanz MD, Manzanares Alonso P. Análisis físico-químico de las aguas minero-medicinales del Balneario de La Toja. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1991; Monografía nº19. 22-36.
7. García Puertas M, Torija Isasa ME, García Mata M, Vidal Marín M, Manzanares Alonso P. Análisis físico-químico de las aguas minero-medicinales de los Balnearios de Fitero. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1991; Monografía nº18. 31-43.
8. Torija Isasa ME, Orzáez Villanueva MT, García Mata M, Tenorio Sanz MD, Prádena Lobón JM. Análisis físico-químico de las aguas del Balneario "El Paraíso" de Manzanera (Teruel). Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2001; Monografía nº24. 12-26.
9. García Puertas M, Torija Isasa ME, Orzáez Villanueva MT. Análisis físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Arnedillo. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1988; Monografía nº14. 29-32.
10. Torija Isasa ME, Orzáez Villanueva MT, García Mata M, Tenorio Sanz MD. Análisis físico-químico de las aguas del Balneario de Alicún de las Torres. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2009; Monografía nº30. 737-752.
11. Torija Isasa ME, García Mata M, Orzáez Villanueva MT, Tenorio Sanz MD, Prádena Lobón JM. Análisis físico-químico de los manantiales del Balneario Cervantes. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2006; Monografía nº27. 259-276.
12. De la Rosa Jorge MC, Pintado García C, Rodriguez Fernandez C, Mosso Romeo MA. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2009; Monografía nº30. 763-780.
13. De la Rosa Jorge MC, Mosso Romeo MA, Vivar MC, Medina MR., Arroyo G, Díaz F.Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario de La Toja. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1993; Monografía nº19. 43-52.
14. Mosso Romeo MA, Sánchez Beltrán MC, Rodriguez Fernandez C, De la Rosa Jorge MC. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2006; Monografía nº27. 285-304.
15. De la Rosa MC, Mosso MA, Díaz F, Vivar MC, Medina MR. Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales de Fitero. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1991; Monografía nº18. 45-60.
16. Pascual MR. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 1982

17. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacterias from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 49: 1-7
18. Mosso Romeo MA, De la Rosa Jorge MC, Vivar MC. Microbiología del manantial Hervideros del Balneario Cofrentes. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1998; Monografía nº22. 53-63.
19. De la Rosa Jorge MC, Sánchez Beltrán MC, Rodriguez Fernandez C, Mosso Romeo MA.Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2007; Monografía nº28. 251-265
20. De la Rosa Jorge MC, Mosso Romeo MA, Prieto MP. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario "El Paraíso" de Manzanera (Teruel). Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2001; Monografía nº24. 35-48.
21. Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993) Cowan and Steel´s. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge Universtity Press. Cambridge.
22. Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005) Bergey´s Manual of Sistematic Bacteriology. Second Ed. Vol. II. The *Proteobacteria*. Part B and C.Springer. New York.
23. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero 2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado. Núm. 45, de 21 de febrero 2003.
24. Real Decreto 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 comercio de aguas de bebida envasadas. Boletín Oficial del Estado. Núm. 312, de 30 de diciembre de 2003.
25. Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano. Boletín Oficial del Estado. Núm. 16, de 19 de enero de 2011.
26. Madigan M., Martinko J., Stahl D,Clark D. Brock Biology of Microorganisms, 13th Ed., Pearson. San Francisco. 2011
27. Pochon J, Tardieux P. Techniques d´analyse en microbiologie du sol. Ed. De la Tourelle. St. Mandé (Seine). 1956
28. Rodina AG. Methods in aquatic microbiology. Ed. University Park Press. Baltimore. 1972

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

29. Mosso Romeo MA, De la Rosa Jorge MC, Diaz Alonso F. Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales y de los lodos del Balneario de Arnedillo. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1988; Monografía nº14. 19-26.
30. Mosso Romeo MA, De la Rosa Jorge MC, Diaz Alonso F,Gastón de Iriarte y Sánche E. Microbiología del agua de Carabaña. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1981; Monografía nº8. 19-26.
31. De la Rosa, M. C., Andueza, F., Sánchez, M. C., Rodríguez, C. & Mosso, M. A. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2004. Monografía nº26. 521-542.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.