



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**AGUAS MINEROMEDICINALES  
HIPERTERMALES: SALUD, DIVERSIDAD  
MICROBIANA Y CONTROL DE  
CALIDAD**

Autor: Miguel Seguí Fernández

D.N.I.: 05944259-R

Tutor: Carmina Rodríguez Fernández

Convocatoria: Febrero 2016

## Resumen

Se ha estudiado comparativamente la diversidad microbiana y las principales características físico-químicas de 10 Balnearios y 21 manantiales españoles, de aguas mineromedicinales clasificadas como hipertermales, utilizadas en diversos tratamientos terapéuticos y balneoterapia. Se ha llevado a cabo la recopilación y el análisis de los datos procedentes de los trabajos pluridisciplinarios realizados por la Comisión de Aguas Mineromedicinales de la Real Academia Nacional de Farmacia, durante los últimos 25 años. 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 potables. 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*; sólo en un caso se han encontrado bacterias del Phylum *Bacteroidetes*. Las poblaciones microbianas en los manantiales hipertermales son predominantemente mesófilas y oligotrofas, que se adaptan a las altas temperaturas. Las principales actividades metabólicas de las bacterias autóctonas son proteolíticas, amilolíticas y amonificantes. Los géneros más frecuentes encontrados en todos los manantiales son *Pseudomonas* (81%), *Bacillus* (76%), *Staphylococcus* (67%), *Cellulomonas* (57%), y *Micrococcus* (52%); y con menor frecuencia *Enterobacter* y *Arthrobacter* (52%). 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.

*Palabras clave:* Manantiales hipertermales. Biodiversidad. Balneoterapia. Calidad sanitaria.

### 1. Objetivos. Introducción y antecedentes.

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado ha sido analizar comparativamente la diversidad microbiana y las principales características físico-químicas de 10 Balnearios y 21 manantiales españoles, de aguas mineromedicinales clasificadas como hipertermales, utilizadas en diversos tratamientos terapéuticos. Las aguas minerales de balnearios termales presentan una gran diversidad de microorganismos autóctonos característicos de cada tipo de agua y que dependen de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, composición, nutrientes) y de la relación entre los organismos y el ambiente. 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. Actualmente existe un gran interés por el estudio de la biodiversidad en ambientes extremos

con el fin de determinar qué características permiten a estos microorganismos sobrevivir y qué función tienen en los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza. Las aguas minerales hipertermales de los balnearios son uno de estos hábitats extremos debido a sus altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, condiciones desfavorables para la vida de muchos seres vivos. Sin embargo, se sabe que estas aguas minerales, como cualquier ambiente acuático natural, poseen una microbiota característica de cada tipo de agua. También pueden encontrarse en ellas microorganismos alóctonos, procedentes de otros hábitats (suelo, heces, vegetales), considerados como contaminantes pero que coexisten con los autóctonos, adaptándose a las condiciones adversas, siendo los de mayor interés sanitario *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. La presencia de estos microorganismos patógenos puede suponer un riesgo sanitario para los usuarios de los balnearios, ya que estas aguas se utilizan en tratamientos terapéuticos tanto por vía oral como tópica.

Las distintas propiedades atribuidas a las aguas son debidas a sus parámetros fisicoquímicos, como pH sales disueltas en ellas, por lo que cada manantial tiene unos usos distintos.

- Por vía oral, el tratamiento con aguas mineromedicinales puede tener efectos sobre:
  - Aparato digestivo: acciones diversas sobre el estómago, intestino, hígado y vías biliares.
  - Aparato urinario: El pH elevado del agua evita la precipitación de oxalatos y uratos, previniendo formación de cálculos. Asimismo, las aguas pueden tener efectos diuréticos
  - Sistema nervioso vegetativo: Los iones calcio se comportan como reguladores del equilibrio neurovegetativo
  - Prevención de caries: Debido a presencia de fluoruros en el agua.
- Por vía tópica, la administración se realiza en forma de baños generales o parciales, duchas y chorros ya que la acción fundamental de la aplicación tópica se debe a las características físicas del agua (mecánicas y térmicas). Además, el agua y los elementos minerales disueltos en ella pueden ser absorbidos a través de la piel y ejercer sus acciones a nivel local y general.
- Existen otros tipos de terapia, como por ejemplo, la balneoterapia, que puede ser considerada como una terapia de acción estimulante de la capacidad de defensa orgánica y como un factor de acción general inespecífico.

- No se deben olvidar factores derivados ambiente balneario y que se pueden dar en todos aquellas personas sometidas a la cura termal: disminución de estrés, contacto con la naturaleza, relación con otras personas, etc
- La vía inhalatoria tiene también cierto interés y es aplicada en algunos casos en forma de ducha y pulverización faríngeas, en afecciones de vías respiratorias altas.

## 2. Metodología

Se ha llevado a cabo la recopilación y el análisis comparativo de los datos procedentes de los trabajos pluridisciplinares realizados por la Comisión de Aguas Mineromedicinales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Esta investigación se ha centrado en los aspectos fisicoquímicos y microbiológicos de los manantiales hipertermales españoles, estudiados en los últimos 25 años.

Los Balnearios y manantiales analizados en esta memoria son:

Granada	Alhama de Granada	Baño árabe
		Baño nuevo
Lérida	Caldas de Bohí	Aguas de Baños
		Estufas
		Fuente del Bosch
		Fuente Tartera
		Canen
Lugo	Termas Romanas de Lugo	Termas Romanas de Lugo
Murcia	Fortuna	Fortuna
Pontevedra	La Toja	Puerta
		Mar
		Capilla
Navarra	Fitero	Bécquer
		Palafox
Murcia	Archena	Archena
Zaragoza	Jaraba	La Peña
		San Luis
		San Vicente
		La Virgen
Barcelona	Blancafort La Garriga	Blancafort La Garriga
Castellón	Villavieja	Villavieja

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Características fisicoquímicas

#### 3.1.1. Temperatura

La característica común a todos los manantiales de este estudio es la elevada temperatura de las aguas, clasificándose como hipertermales (temperatura superior a 37 °C) <sup>(1)</sup>, excepto los del balneario de Jaraba (La Peña, San Luis, La Virgen) <sup>(2)</sup>, actualmente clasificados oficialmente como hipotermas (menor de 35 °C) <sup>(1)</sup> (Fig. 1).

Éstos últimos se han incluido en este estudio ya que antiguamente la temperatura de emergencia del agua era superior. Esta es una característica que viene observándose en algunos manantiales termales.

### 3.1.2. Dureza

En cuanto a dureza del agua, la mayoría de los manantiales estudiados son de aguas extremadamente duras (más de 400mg/L)<sup>(1)</sup>; excepto los de Caldas de Bohí, Termas Romanas de Lugo y Blancafort La Garriga que son de aguas muy blandas (entre 0 y 100 mg/L) (Fig. 2). Destacan por su elevada dureza los manantiales de La Toja (Puerta, Mar y Capilla), superando los 3 000 mg/L de CaCO<sub>3</sub><sup>(3)</sup>.

### 3.1.3. Bicarbonatos

La Directiva Comunitaria 80/777CE indica que un agua bicarbonatada será aquella que contenga más de 600 mg/L. Ninguno de los manantiales supera esta cifra. Nuevamente, los de La Toja, junto con los manantiales de Jaraba, son los más bicarbonatados (Fig. 3).

### 3.1.4. Hierro

En concentración de hierro son de nuevo los manantiales de La Toja los más ferruginosos, (7 000-8 000 mg/L); y en menor medida, el manantial del balneario de Archena (1 000 mg/L) (Fig. 4).

### 3.1.5. Sulfatos

En concentración de sulfatos destacan los manantiales del Balneario Fitero y el Balneario Fortuna 1 300 mg/L y 800 mg/L (Fig. 5).

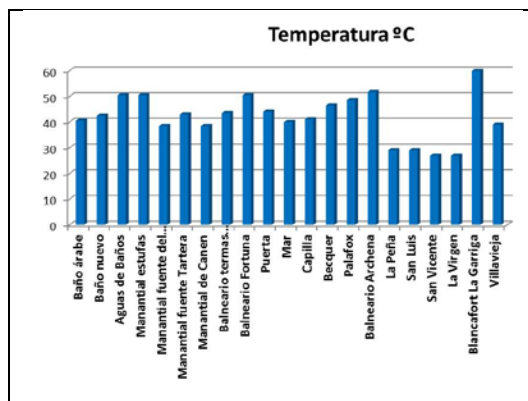


Figura 1. Temperatura de emergencia de los manantiales hipertérmicos.

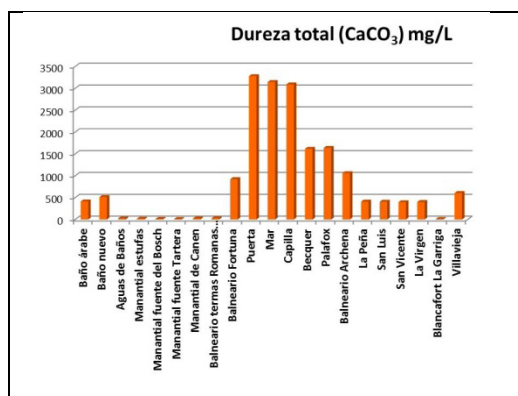


Figura 2. Dureza total de los manantiales hipertérmicos.

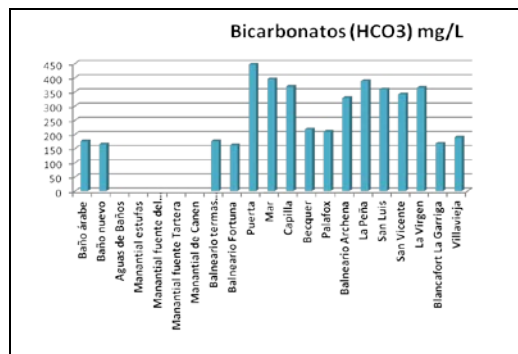


Figura 3. Concentración de bicarbonatos de los manantiales hipertérmicos.

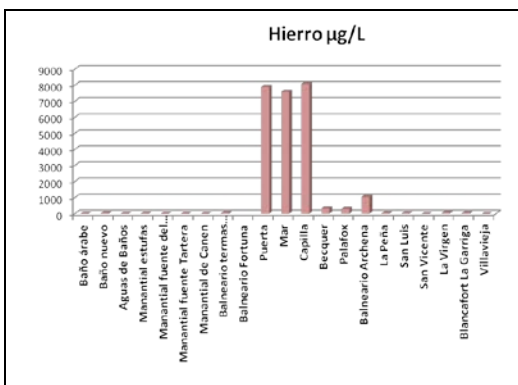


Figura 4. Concentración de hierro de los manantiales hipertérmicos.

### 3.1.6. Sodio y cloruros

Los niveles de cationes sodio y aniones cloro son notablemente altos en los manantiales del balneario de la Toja (8 000 mg/L y 16 000 mg/L, respectivamente) (Figs. 6 y 7). Esto es probablemente debido a su localización, a nivel del mar y en su proximidad. Los tres manantiales poseen una composición muy similar, lo que hace pensar que su agua proviene de la misma fuente que emerge por tres puntos distintos<sup>(3)</sup>.

### 3.2. Microorganismos totales y viables

El recuento de los microorganismos totales y viables, actualmente se realiza sistemáticamente por dos métodos: epifluorescencia (naranja de acridina 0,1%) y citometría de flujo (tiñendo con isotiocianato de fluoresceína 50 µm/mL, y yoduro de propidio 0,005%; que tiñen las células vivas y muertas, respectivamente)<sup>(4)</sup>. Una de las dificultades en nuestro análisis comparativo, ha sido precisamente el cambio en los métodos utilizados para este tipo de recuentos, desde 1984 (Archena). Esto ha limitado la interpretación de los datos de los que se dispone y las conclusiones finales.

En los manantiales de Alhama de Granada<sup>(4)</sup>, se ha encontrado un elevado número de microorganismos totales (alrededor de  $1 \times 10^6$  UFC/ml), de los cuales el 92-95% están vivos (Figs. 8 y 9).

En el balneario de Termas Romanas de Lugo<sup>(5)</sup>, se obtuvo un número muy elevado de microorganismos totales ( $1,1 \times 10^6$  UFC/ml), sin embargo, sólo un 18,2% de éstos son viables (Figs. 8 y 9).

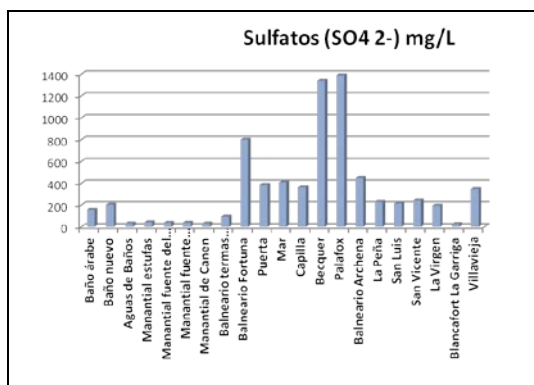
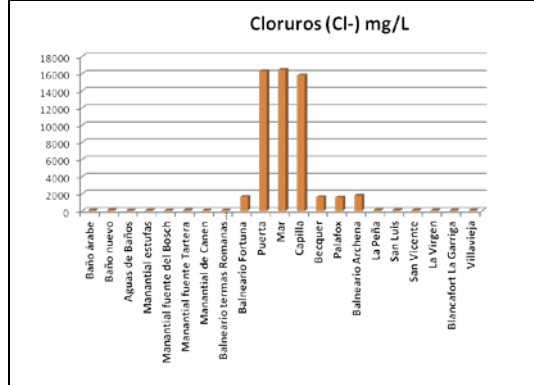
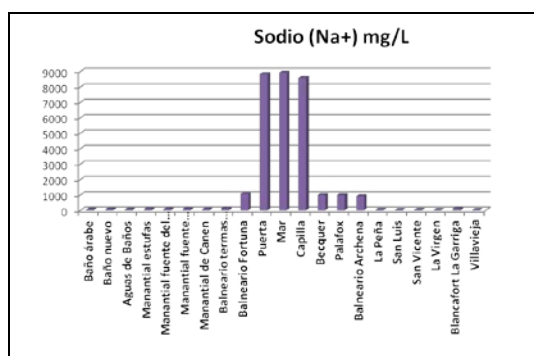


Figura 5. Concentración de sulfatos de los manantiales hipertermales.



Figuras 6 y 7. Concentración de sodio y cloruros de los manantiales hipertermales.

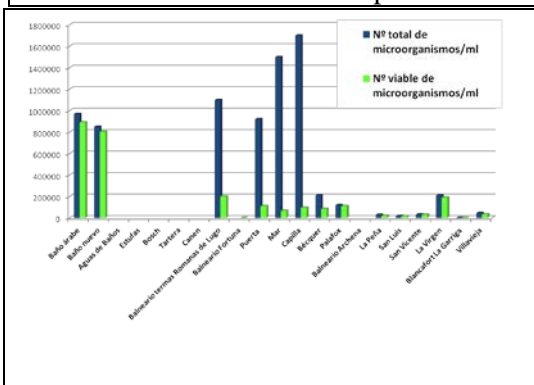


Figura 8. Número de microorganismos totales y viables/ml de los manantiales hipertermales.

En los manantiales de la Toja<sup>(3)</sup> el número de microorganismos totales es también muy elevado ( $1-1,6 \times 10^6$  UFC/ml) (Puerta  $9,2 \times 10^5$  UFC/ml; Mar  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml; Capilla  $1,7 \times 10^6$  UFC/ml); y como en Lugo, hay muy pocos vivos (4-12%). (Figs. 8 y 9). Es posible que las extremas condiciones de temperatura del agua y elevada concentración de sales, limiten el crecimiento de los microorganismos.

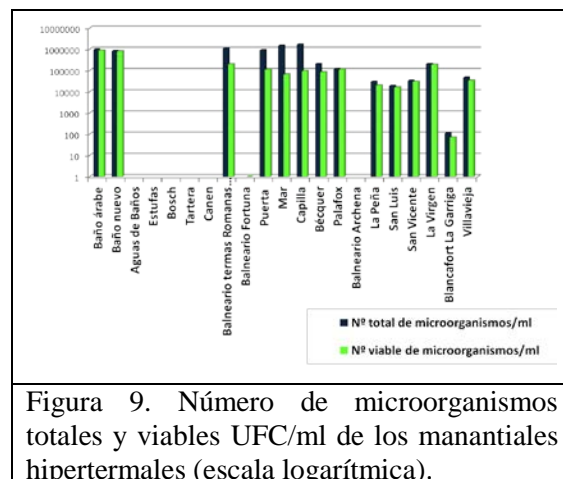


Figura 9. Número de microorganismos totales y viables UFC/ml de los manantiales hipertermales (escala logarítmica).

En los manantiales del Balneario de Fitero<sup>(6)</sup> se encuentran un número de microorganismos bajo ( $2,1 \times 10^5$  y  $1,2 \times 10^5$  UFC/ml). De éstos, en el manantial Bécquer, donde más microorganismos se detectaron, sólo el 40% están vivos, mientras que en el manantial Palafox el 91,6% están vivos (Figs. 8 y 9).

Así mismo, en Jaraba<sup>(2)</sup>, en los manantiales La Peña, San Luis y San Vicente, también se encontró un número bajo ( $2 \times 10^4$  -  $3 \times 10^4$  UFC/ml), siendo superior en el manantial Pilas (La Virgen) ( $2,1 \times 10^5$  UFC/ml). En todos los casos el número de microorganismos viables está entre el 75% y el 85%. (Figs. 8 y 9). Estas cifras tan similares sugieren que todos los manantiales proceden de un mismo origen geotermal.

En el balneario Blancafort La Garriga<sup>(7)</sup>, el número de microorganismos totales encontrado ha sido muy bajo (112 UFC/ml), de los cuales el 62,5% estaba vivo. (Figs. 8 y 9). Es posible que la baja cantidad de microorganismos se deba a la elevada temperatura del manantial (la más alta de los estudiados, 60 °C) (Fig. 1).

En el manantial de Villavieja<sup>(8)</sup>, El número de microorganismos totales ha sido bajo ( $4,7 \times 10^4$  UFC/ml), siendo el porcentaje de vivos 72,2% (Figs. 8 y 9).

En los balnearios de Caldas de Bohí, Fortuna y Archena no había información suficiente sobre recuento de microorganismos para poder ser incluida, debido a la metodología.

### 3.3. Bacterias aerobias viables heterotrofas y oligotrofas

El recuento de las bacterias viables se realiza por el método de dilución en placa en los medios: agar recuento en placa (PCA) (heterotrofas)<sup>(9)</sup> y agar R2A (oligotrofas)<sup>(10)</sup>, incubando a 22 °C durante 5 días, y a 37 °C y 45 °C 2 días.

En los manantiales de Alhama de Granada<sup>(4)</sup> se ha detectado un número muy bajo de bacterias heterotrofas (<10 UFC/ml) y oligotrofas (<100 UFC/ml). El número de bacterias heterotrofas y oligotrofas son similares respectivamente a las tres temperaturas (Figs. 10, 11, 12), lo que probablemente indica que la mayoría son mesófilas y que se han adaptado a vivir a las

temperaturas del manantial (40-42 °C). Asimismo, se observa que hay mayor crecimiento en el medio mínimo (R2A) que en el medio nutritivo (PCA), lo que indica que la población predominante es oligotrófica.

En los cinco manantiales de Caldas de Bohí<sup>(11)</sup> (Baños, Estufas, Bosch, Tartera y Canen) el número de bacterias heterotrofas y oligotrofas ha sido muy bajo (50-600 UFC/ml), a las tres temperaturas. Excepto en el manantial Estufas, en el que no crecen a 22 °C ni heterotrofas ni oligotrofas, pero sí a 37 °C y 45 °C. En éste último, las oligotrofas crecen especialmente bien a 45 °C ( $3 \times 10^3$  UFC/ml), lo que indica presencia de una población termófila y oligotrófica. (Figs. 10, 11, 12).

En el balneario de Termas Romanas de Lugo<sup>(5)</sup> hay un número bajo de bacterias heterotrofas y oligotrofas (alrededor de 350 UFC/ml) a las tres temperaturas. Las diferencias entre las distintas temperaturas y medios son pequeñas, lo que indica que probablemente sean bacterias que crecen en un rango amplio de temperaturas (Figs. 10, 11, 12).

En el balneario Fortuna<sup>(12)</sup> (Termas) se realizaron cuatro tomas de muestra, en distintos meses. Especialmente, en la última muestra se obtuvo un número elevado ( $9 \times 10^2$ - $5 \times 10^3$ ) tanto de bacterias heterotrofas como oligotrofas, a las tres temperaturas de incubación. En tomas anteriores, el número de bacterias fue inferior. Además de este resultado, la observación de que crecen mejor a 37 °C que a 22 °C y mejor en agar nutritivo que en medio mínimo, hace pensar que en el momento de la toma de la muestra pudiera haber habido una contaminación del agua por bacterias alóctonas. No se detectaron bacterias termófilas estrictas. (Figs. 10, 11, 12).

En los manantiales de la Toja<sup>(3)</sup>, en las muestras tomadas en superficie, tanto el número de heterotrofas como de oligotrofas, fue similar 22 °C y 37 °C y muy bajo a 45 °C: Puerta (40-300

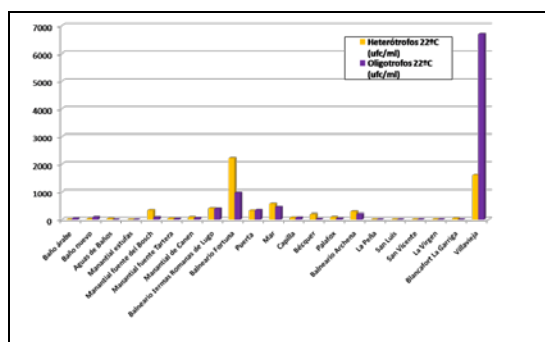


Figura 10. Bacterias viables heterotrofas y oligotrofas a 22 °C, de los manantiales hipertermales.

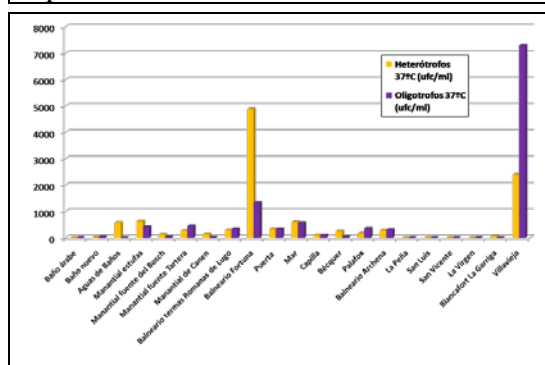


Figura 11. Bacterias viables heterotrofas y oligotrofas a 37 °C de los manantiales hipertermales.

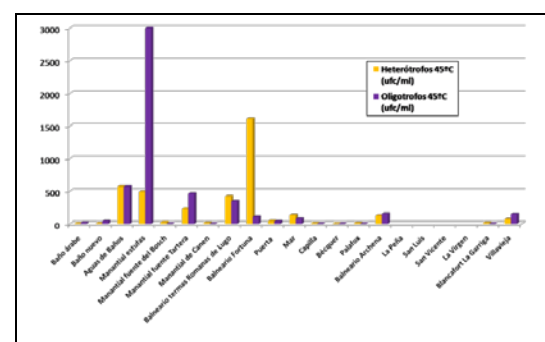


Figura 12. Bacterias viables heterotrofas y oligotrofas a 45 °C de los manantiales hipertermales.

UFC/ml), Mar (100-600 UFC/ml) y Capilla (2-100 UFC/ml). En el manantial Capilla prácticamente no hay crecimiento a la temperatura más elevada (*Figs. 10, 11, 12*).

En los manantiales del balneario Fitero<sup>(6)</sup> se ha encontrado un número bajo de bacterias heterotrofas (150-250 UFC/ml) y oligotrofas (15-50 UFC/ml) a 22 °C y 37 °C en ambos manantiales (Bécquer y Palafox). Sin embargo, a 45 °C prácticamente no hay crecimiento, lo que indica que las bacterias existentes son principalmente mesófilas. Además, en Palafox se observa mayor crecimiento de bacterias oligotrofas que heterotrofas a 37 °C (360 UFC/ml) (*Figs. 10, 11, 12*). La baja presencia de especies alóctonas indica la buena protección de los puntos de emergencia de las aguas de los manantiales.

En el balneario de Archena<sup>(13)</sup>, el número de bacterias heterotrofas y oligotrofas encontrado (100-300 UFC/ml) fue superior a 22 °C y 37 °C que a 45 °C, lo que hace pensar que la microbiota autóctona oligotrofa crece mejor a menores temperaturas. En un ensayo se detectó mayor presencia de bacterias alóctonas (37 °C y medio nutritivo) (*Figs. 10, 11, 12*).

En todos los manantiales de Jaraba<sup>(2)</sup> se ha obtenido una bajísima cantidad de bacterias heterotrofas y oligotrofas a las tres temperaturas (<10 UFC/ml). Esto indica que la protección de aguas de los manantiales es adecuada. La población existente parece ser oligotrófica (*Figs. 10, 11, 12*).

En el balneario de Blancafort La Garriga<sup>(7)</sup> el número de bacterias heterotrofas y oligotrofas ha sido bajo (<100 UFC/ml), a las tres temperaturas de cultivo, algo que probablemente se deba al pH alcalino y la elevada temperatura del agua (60 °C). A pesar de que Blancafort tiene las aguas que emergen a la temperatura más elevada de todos los manantiales estudiados, el crecimiento a 45 °C es muy escaso. Hay más bacterias heterotrofas que oligotrofas. (*Figs. 10, 11, 12*), por lo que la población es termófila facultativa heterotrofa.

El balneario de Villavieja<sup>(8)</sup> presenta un número de bacterias heterotrofas ( $2 \times 10^3$  UFC/ml) y oligotrofas ( $7 \times 10^3$  UFC/ml) elevado a las temperaturas de cultivo 22 °C y 37 °C. La población de este manantial está constituida mayoritariamente por bacterias oligotrofas mesófilas, que se han adaptado a la temperatura del manantial (39 °C) (*Figs. 10, 11, 12*).

### **3.4. Tipos morfológicos y clasificación taxonómica**

En relación con las bacterias heterotrofas, las aguas hipertermales presentan una mayor proporción de bacterias Gram positivas de los Phyla *Firmicutes* y *Actinobacteria*, mientras que en las mesotermas predominan los bacilos Gram negativos del Phylum *Proteobacteria* y los cocos Gram positivos. La elevada temperatura de las aguas hipertermales puede ser la causa de

esta diferencia, ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor y a la concentración de sales.

Esto ocurre en el balneario de Alhama de Granada<sup>(4)</sup>, ya que un 80% de las bacterias son Gram positivas. Los bacilos Gram positivos encontrados son *Bacillus* y bacilos regulares no esporulados, mientras que los cocos Gram positivos pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Las bacterias Gram negativas no fermentadoras son en su mayoría de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* y *Alcaligenes*.

En el manantial de Lugo<sup>(5)</sup> se observa que un 50% de las bacterias encontradas son bacilos Gram positivos de los Phyla *Firmicutes* y *Actinobacteria*, en su mayoría *Bacillus* (aunque también se han encontrado *Arthrobacter* y *Cellulomonas*). *Bacillus* se encuentra distribuido por la naturaleza ampliamente, encontrándose tanto en suelo como en aguas, ya sean termales o aguas naturales, ya que es muy resistente a condiciones subóptimas. Los bacilos Gram negativos encontrados, del Phylum *Proteobacteria* representan el 34,4% de las cepas, y predominan *Enterobacter* y *Pseudomonas*, muy frecuentes en aguas minerales (Figs. 13 y 14).

En el balneario de la Toja<sup>(3)</sup> se observa una gran predominancia de bacilos Gram positivos del Phylum *Firmicutes* con respecto a otros tipos de bacterias. En este caso, también *Bacillus* es el género predominante. No se puede determinar la causa de su presencia, podrían ser autóctonas o bien proceder del suelo o de filtraciones de agua de mar. Se han aislado varias cepas pigmentadas en amarillo, rosa y naranja, que son frecuentes en aguas termales y suelos salinos (lo que concuerda con las características del agua de los manantiales estudiados). Respecto a los bacilos Gram negativos aislados, se han encontrado diversas especies de *Enterobacter* y *Pseudomonas*, que también se hallan en otros manantiales (*Pseudomonas*, en concreto, es muy frecuente, aparece en el 80% de los manantiales estudiados) (Figs. 13 y 14). No se encontró *Pseudomonas aeruginosa*.

En los cuatro manantiales de Jaraba<sup>(2)</sup> predominan los bacilos Gram negativos del Phylum *Proteobacteria*. Esta población mayoritaria es distinta a los otros manantiales estudiados en este trabajo, lo que puede deberse a la menor temperatura del agua de los manantiales (alrededor de 27 °C). De los bacilos Gram negativos no fermentadores, el género *Pseudomonas* es el más abundante. De los bacilos fermentadores, destaca *Enterobacter cloacae*, presente en los manantiales de San Vicente, San Luis y especialmente en La Peña. En éste último constituye más del 80% de todas las cepas encontradas. *E. cloacae* es frecuente en aguas minerales y mineromedicinales. De los pocos cocos Gram positivos que se encuentran, en su mayoría pertenecen al género *Staphylococcus*, y es probable que lleguen al agua del manantial procedentes de fuentes externas, ya sea lluvia, suelo o aire (Figs. 13 y 14). Es importante

señalar que en los manantiales de San Vicente y Pilas (La Virgen) se ha encontrado una gran diversidad de microorganismos, mientras que en La Peña sólo se han encontrado cinco especies distintas.

En el balneario de Villavieja<sup>(8)</sup>, como en los balnearios de Jaraba, la mayor parte de los microorganismos presentes son bacilos Gram negativos (70%), seguidos de bacilos Gram positivos (25%). El género más frecuente ha sido *Pseudomonas*, especialmente la especie *P. pseudoalcaligenes*. Los bacilos Gram positivos detectados son principalmente *Arthrobacter* y *Leifsonia*, y una pequeña cantidad de *Bacillus* (Figs. 13 y 14).

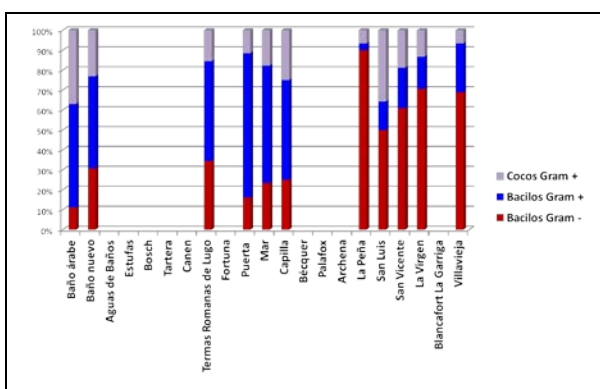


Figura 13. Clasificación morfológica de las bacterias de los manantiales hipertermales.

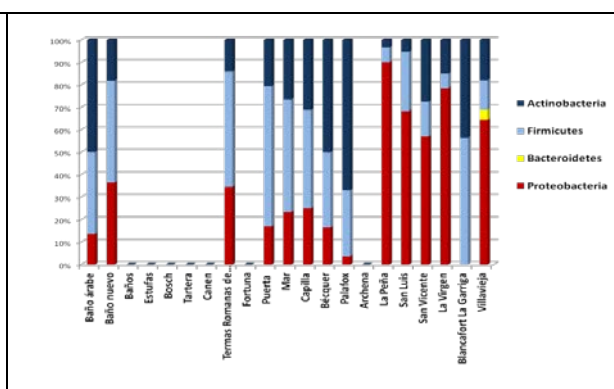


Figura 14. Clasificación taxonómica de las bacterias de los manantiales hipertermales

En los trabajos sobre los balnearios de Caldas de Bohí, Fortuna y Archena no había información suficiente sobre la clasificación morfológica y taxonómica de la microbiota de sus aguas. Asimismo, los datos publicados de los balnearios de Fitero y Blancafort tampoco recogen información suficiente en estos aspectos, por lo que no se han podido incluir en este trabajo. Esto es debido a la antigüedad de dichos trabajos y a la metodología utilizada.

### 3.5. Microorganismos de interés sanitario

Las aguas mineromedicinales se utilizan en los balnearios con fines terapéuticos, por lo que deben tener ausencia de bacterias que indiquen contaminación fecal y de microorganismos patógenos que puedan transmitirse a través del agua por vía oral o tópica.

No se han encontrado indicadores fecales (*E. coli*, *Enterococcus* y *Clostridium* sulfito reductores) ni bacterias patógenas (*Salmonella*, *Legionella*, y *S. aureus*) en 250 ml de agua, en ninguno de los manantiales estudiados.

En muchos de los manantiales estudiados se han encontrado bacterias del género *Pseudomonas* spp; y sólo en algunos se detectó *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria es común y puede encontrarse en suelos y en aguas superficiales contaminadas con aguas residuales. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista 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. Por tanto, la normativa española de aguas de consumo humano no permite su presencia en aguas de bebida envasadas (RD 1744/2003 y RD 1798/2010) ni en balnearios (manantiales). *P. aeruginosa* es capaz de vivir con escasos nutrientes y a temperaturas de 42 °C, lo que hace posible su supervivencia en estas aguas. Asimismo, en algunos baños se han encontrado un número bajo de coliformes, estreptococos y/o esporas de clostridios. Ya que en ninguno de los manantiales se han encontrado indicadores fecales, se puede considerar, que pueden proceder de filtraciones desde el suelo o de otras aguas. Sin embargo, sería recomendable, para evitar la presencia de estas bacterias, la desinfección de arquetas y canalizaciones, así como el aislamiento de la captación para evitar filtraciones.

### 3.6. Microorganismos de interés ecológico

Las bacterias proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas, amonificantes, nitrificantes y sulfato reductoras, se determinan por la técnica del número más probable (NMP), utilizando los medios descritos en Pochon y Tardieux <sup>(14)</sup> y el medio de Starkey<sup>(15)</sup> para las últimas, e incubando a 30 °C, 15 días.

Las principales actividades metabólicas de las bacterias autóctonas son amonificantes, proteolíticas y amilolíticas. Algunos de los manantiales sulfatados estudiados también presentan bacterias sulfato-reductoras en número bajo. Estas comunidades microbianas desempeñan un papel fundamental en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre transformando los compuestos orgánicos, proporcionando los nutrientes esenciales para la viabilidad y equilibrio del ecosistema y contribuyendo a la depuración de los contaminantes orgánicos. En ambientes con concentraciones bajas de compuestos orgánicos, son las bacterias oligotróficas las que tienen una mayor capacidad para utilizarlos, reciclando el carbono.

En el Balneario de Alhama de Granada<sup>(4)</sup>, el manantial Baño Árabe posee mayor número de bacterias proteolíticas y amonificantes ( $1,4 \times 10^3$  NMP/ml) que las presentes en el Baño Nuevo ( $1,8-5 \times 10^2$  NMP/ml). Estas bacterias pertenecen, principalmente, a los géneros: *Bacillus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas*. Las bacterias amonificantes (Baño Árabe  $1,4 \times 10^3$  NMP/ml; Baño Nuevo  $6,3 \times 10^3$  NMP/ml) son *Bacillus* y *Pseudomonas*. Las bacterias celulolíticas pertenecen al género *Cellulomonas*. Se observa que sólo se han detectado bacterias nitrificantes (40 NMP/ml) en el Baño Árabe (del género *Arthrobacter*). En ambos manantiales se han encontrado bacterias sulfato reductoras que producen sulfhídrico y bacterias quimioautótrofas (*Thiobacillus*, *Thiovulum* y *Beggiatoa*) (Fig. 15).

En los manantiales de Caldas de Bohi<sup>(11)</sup> (Fig. 15) se han aislado el mayor número de microorganismos proteolíticos y amilolíticos ( $>2,4 \times 10^5$  NMP/ml), aunque variable dependiendo de los distintos manantiales.

En el manantial de Termas Romanas de Lugo<sup>(5)</sup> se han encontrado un número elevado de bacterias amilolíticas y proteolíticas ( $1,5-4 \times 10^4$  NMP/ml), pero un número muy elevado de bacterias amonificantes ( $1,1 \times 10^5$  NMP/ml; por encima de la sensibilidad del método usado) (Fig. 15).

En el balneario Fortuna<sup>(12)</sup> predominan las bacterias proteolíticas ( $2,4 \times 10^5$  NMP/ml), aunque el número de amilolíticos y amonificantes también es alto ( $1,5-2,4 \times 10^4$  NMP/ml) (Fig. 15).

En el Balneario de La Toja<sup>(3)</sup>, en los tres manantiales destaca el número de bacterias amonificantes ( $4,6 \times 10^4-2,4 \times 10^5$  NMP/ml), que se han identificado como *Bacillus* y *Enterobacter*. En menor cantidad, se encuentran las amilolíticas ( $7,5 \times 10^3$  NMP/ml) (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*). (Fig. 15)

En el Balneario Fitero<sup>(6)</sup>, mientras que en el manantial Bécquer destaca el número de bacterias proteolíticas ( $4,8 \times 10^4$  NMP/ml), en el manantial Palafox predominan las bacterias amilolíticas y amonificantes ( $7,5-9,4 \times 10^4$  NMP/ml). A pesar de que estas aguas poseen un elevado contenido en sulfatos ( $>1\ 300$  mg/L), no se han detectado bacterias sulfato reductoras (es posible que existan, pero en un número demasiado pequeño para su detección) (Fig. 15).

En el Balneario de Archena<sup>(13)</sup> se han encontrado bacterias amilolíticas (*Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*); y proteolíticas (*Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* y *Staphylococcus* y amonificantes ( $2,4 \times 10^3$  NMP/ml). También se han detectado bacterias sulfato reductoras (21 NMP/ml) (Fig. 15).

En el Balneario Jaraba<sup>(2)</sup> se ha encontrado un número muy bajo de microorganismos (menos de  $10^3/100$ ml). En todos los manantiales salvo en Pilas (La Virgen), en su mayoría son amonificantes, del género *Pseudomonas*, aunque también se observan proteolíticos, amilolíticos y celulolíticos. En el manantial Pilas destacan los amilolíticos (*Pseudomonas*). (Fig. 15)

En el Balneario Blancafort La Garriga<sup>(7)</sup>, el número de microorganismos proteolíticos, amilolíticos y amonificantes es muy bajo (50 NMP/ml de media) (Fig. 15).

En el Balneario Villavieja<sup>(8)</sup>, se han encontrado bacterias proteolíticas (*Stenotrophomonas maltophilia* y *Leifsonia aquatica*), amilolíticas (*Bacillus* y *Leifsonia*) y amonificantes (*Arthrobacter*) ( $2,4 \times 10^4$  NMP/ml). Además se han encontrado bacterias sulfato reductoras (43 NMP/ml), del género *Desulfovibrio* (Fig. 15).



Figura 15. Microorganismos de interés ecológico (NMP/100mL) de los manantiales hipertermales.

### 3.7. Diversidad bacteriana

Se ha estudiado la diversidad bacteriana y la frecuencia con la que aparecen en los distintos manantiales hipertermales los géneros y especies más importantes (Figs. 16 a, b). El género más frecuente es *Pseudomonas*, encontrado en un 81% de los manantiales estudiados, seguido de *Bacillus*, presente en un 76,2% de ellos. *Staphylococcus* ha sido encontrado en un 66,7%, *Cellulomonas* en un 57,1%, *Micrococcus* en un 52,4% y *Arthrobacter* en un 38% (Fig. 17).

En el balneario de Alhama de Granada<sup>(4)</sup>, se han aislado 53 cepas de bacterias (27 en el Baño árabe y 26 en el Baño nuevo).

En el balneario de Lugo<sup>(5)</sup> se aislaron 78 cepas, de las cuales sólo fueron identificadas 64.

En el Balneario La Toja<sup>(3)</sup>, se han aislado 43 cepas en el manantial Puerta, 34 en el manantial Mar y 16 en el manantial Capilla.

En el Balneario Fitero<sup>(6)</sup>, se aislaron 43 cepas en el manantial Bécquer y 55 en el manantial Palafox.

En el balneario Jaraba<sup>(2)</sup>, se encontraron se han aislado 254 cepas de bacterias heterotrofas de las cuales 244 han sido identificadas. 66 de las cepas se aislaron del manantial San Vicente, 44 de San Luis, 32 de la Peña y 69 de La Virgen (Pilas).

En el Balneario Blancafort La Garriga<sup>(7)</sup>, se hallaron 42 cepas, 26 bacilos y 16 cocos. 7 cepas no pudieron ser identificadas.

En el balneario de Villavieja<sup>(8)</sup> se han encontrado 45 cepas de bacterias viables. La especie más frecuente ha sido *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Esta especie está caracterizada por ser oligotrófica y crecer a 42 °C, siendo una especie muy adaptada a las condiciones del manantial.

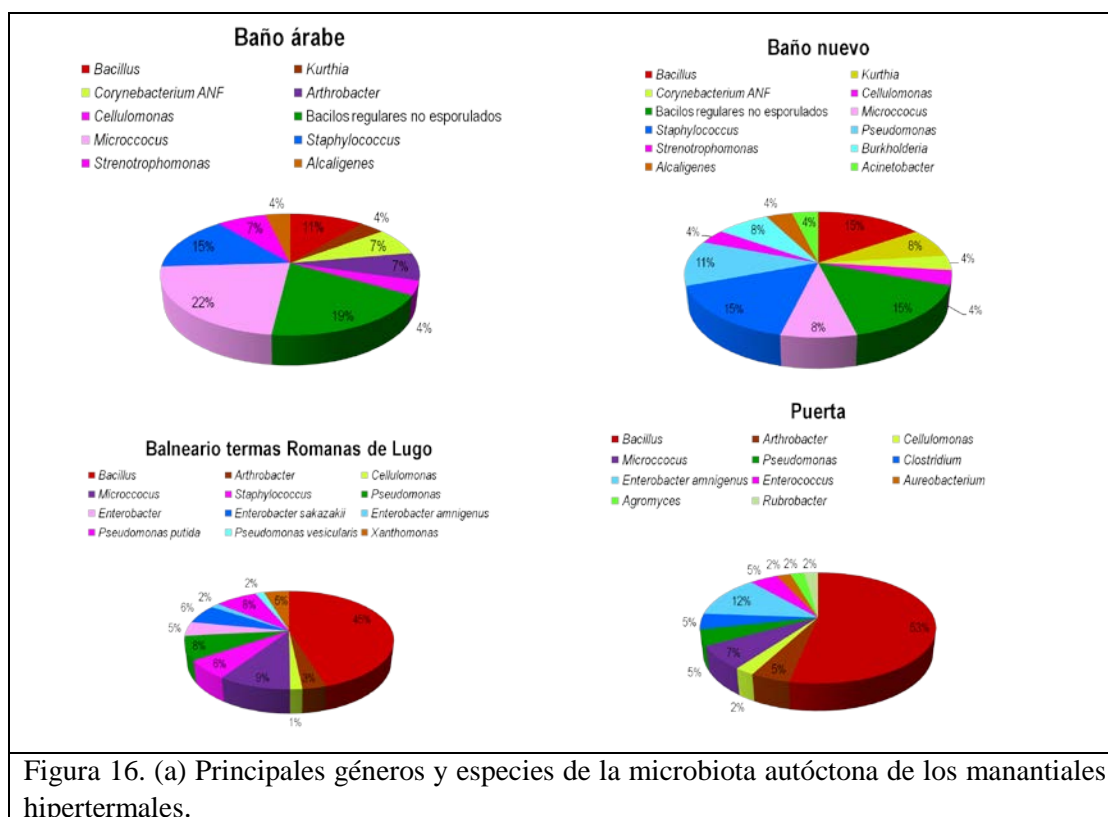


Figura 16. (a) Principales géneros y especies de la microbiota autóctona de los manantiales hipertermales.

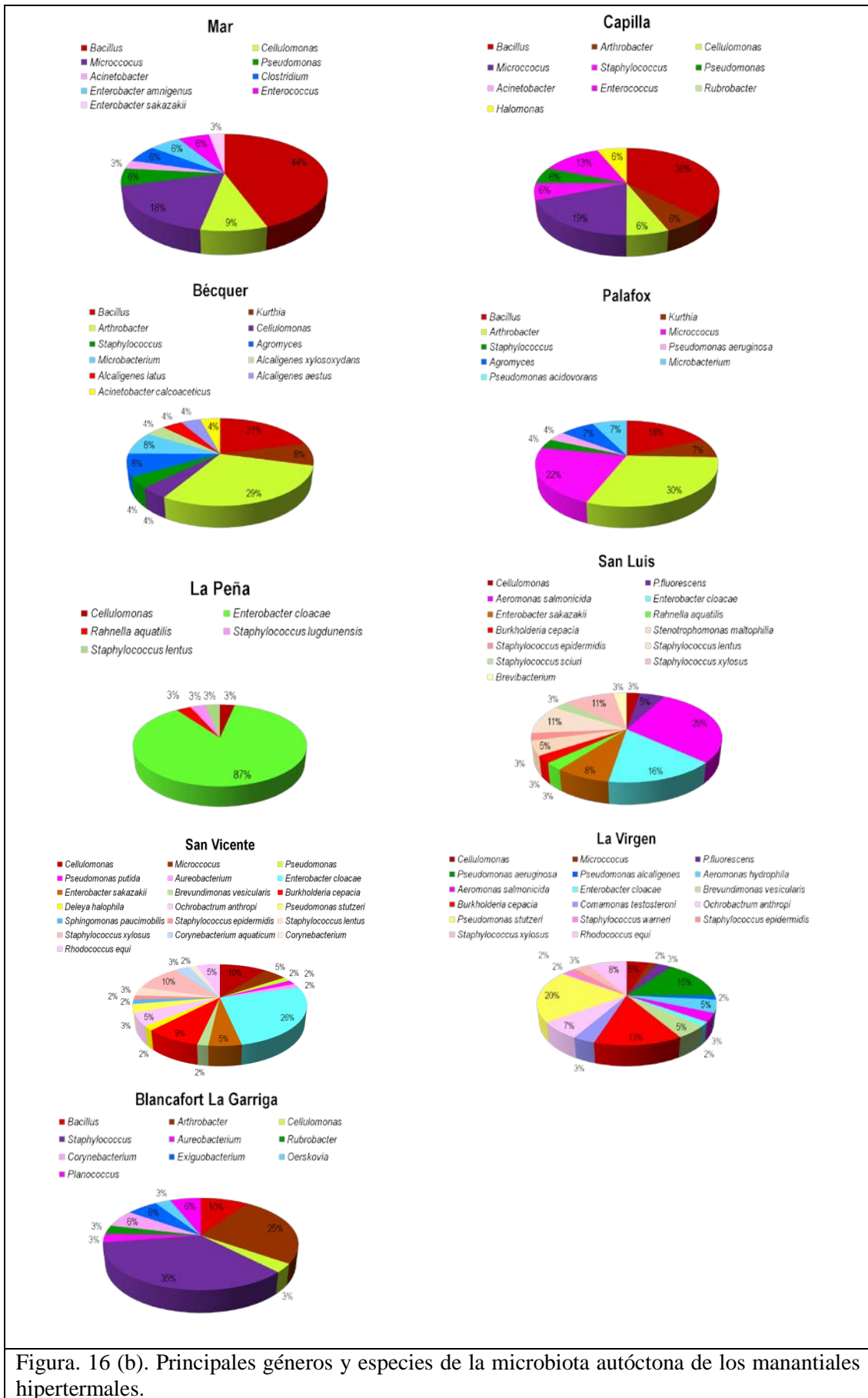
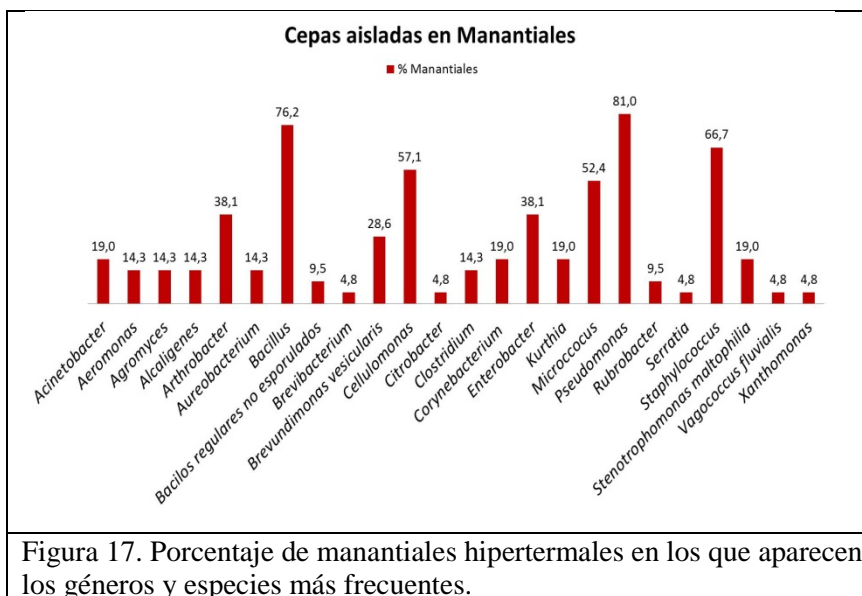


Figura. 16 (b). Principales géneros y especies de la microbiota autóctona de los manantiales hipertermales.



#### 4. Conclusiones

- Los manantiales hipertermales estudiados no contienen microorganismos patógenos ni indicadores de contaminación fecal, por lo que desde un punto de vista sanitario cumplen la normativa microbiológica para aguas potables.
- Las bacterias heterótrofas corresponden a bacilos y cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos.
- En todos los manantiales hipertermales, los géneros más frecuentes son *Pseudomonas* (81%), *Bacillus* (76%), *Staphylococcus* (67%), *Cellulomonas* (57%) y *Micrococcus* (52%); y con menor frecuencia *Enterobacter* y *Arthrobacter* (38%).
- En todos los manantiales se identificaron una gran variedad de especies, muchas de ellas pigmentadas, siendo *Stenotrophomonas maltophilia* la especie más frecuente entre éstas últimas(en el 19% de los manantiales)
- Las poblaciones en los manantiales hipertermales son predominantemente mesófilas y oligotrofas, que se adaptan a las altas temperaturas. 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.

- Es importante mantener una correcta protección de los puntos de emergencia y canalizaciones, a fin de evitar la contaminación de las aguas por bacterias alóctonas.
- 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.

*Nota:* Todas las figuras de esta memoria son originales y fueron realizadas por M. Seguí en este TFG.

## 5. Bibliografía

1. Instituto de Salud Carlos III, Universidad Complutense de Madrid. Vademécum de aguas mineromedicinales españolas. Madrid: Comunidad de Madrid, Instituto de Salud Carlos III. 2003; 52-53
2. De la Rosa Jorge MC, Andueza Leal F, Sánchez Beltrán MC, Rodríguez Fernández C, Mosso Romeo MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid 2004. Monografía nº 26: 521-542.
3. 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.
4. Mosso MA, Sánchez MC, De la Rosa MC. Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2002; Monografía nº26. 46-76.
5. Mosso MA, De la Rosa MC, Vivar MC, Medina MR, Arroyo G, Díaz F. Microbiología de las aguas mineromedicinales del manantial del Balneario de Lugo. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1994; Monografía nº20. 43-52.
6. 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.
7. De la Rosa MC, Mosso MA, Vivar MC, Arroyo G. Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario de Blancafort. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1995; Monografía nº21: 45-52

8. De la Rosa Jorge MC, Pintado García C, Rodríguez Fernández C. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Villavieja. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2015
9. Pascual MR. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 1982
10. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 49: 1-7
11. De la Rosa MC, Mosso MA, Díaz F, Vivar MC. Microbiología de los manantiales de aguas minero-medicinales del Balneario de Caldas de Bohí. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. 1989; Monografía nº15: 23-30
12. De la Rosa MC, Mosso MA, Díaz F, Castellanos JA, García-Arribas ML. Microbiología de los manantiales de aguas minero-medicinales del Balneario de Fortuna. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. 1987; Monografía nº13: 23-30
13. Mosso MA, Díaz F, De la Rosa MC. Microbiología de las aguas mineromedicinales de Archena. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1986; Monografía nº12: 23-32
14. Pochon J, Tardieux P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. De la Tourelle. St. Mandé (Seine). 1956
15. Rodina AG. Methods in aquatic microbiology. Ed. University Park Press. Baltimore. 1972