

Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes

M^a ÁNGELES MOSSO ROMEO, M^a CARMEN SÁNCHEZ
BELTRÁN, CARMINA RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ Y M^a CARMEN
DE LA ROSA JORGE

*Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. Madrid*

RESUMEN

Se han estudiado dos manantiales de aguas bicarbonatadas hipotermales Cervantes y San Camilo, utilizados en los tratamientos terapéuticos en el Balneario Cervantes, situado en Santa Cruz de Mudela (Ciudad Real). Se tomaron muestras en tres épocas del año de los puntos de emergencia y de los tapetes microbianos formados a la salida de los manantiales. El agua muestra un número de microorganismos totales de 10^5 /mL, estando la mayoría vivos (97,1 %). El número de bacterias heterótrofas viables ha sido inferior a 100 ufc/mL y el de esporuladas menor de 5 ufc/mL. Las cepas de bacterias heterótrofas aisladas corresponden, en su mayoría, a bacilos Gram negativos (56,0%) y en menor proporción a bacilos Gram positivos (24,0%) y cocos Gram positivos (14,6%). Los principales géneros de bacilos Gram negativos identificados han sido: *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Ochrobactrum*. Los cocos Gram positivos han sido *Staphylococcus* y los bacilos Gram positivos *Bacillus*. El manantial San Camilo tiene una mayor diversidad que el Cervantes. No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos. Se han detectado microorganismos proteolíticos, amilolíticos y amonificantes en número alto (10^4 /100 mL), sulfato reductores en número medio (10^2 /100 mL), celulolíticos, halófilos y hongos en número inferior a 20/100 mL. Los tapetes microbianos están formados por una asociación de algas verdes (*Cosmarium*), diatomeas, cianobacterias filamentosas (*Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*) y esféricas (*Gloeocapsa*) y bacterias fototrofas filamentosas.

Palabras clave: Manantiales bicarbonatados.-Aguas mineromedicinales.-Balneario Cervantes.-Microbiología.

ABSTRACT

Microbiology of the mineral spring of Cervantes Spa

The hypothermal carbonated spring waters from Cervantes and San Camilo mineral springs were studied. Waters from both mineral springs are used in the curative spa therapy at the Cervantes Spa located in the town of Santa Cruz de Mudela (Ciudad Real). At three different seasons of the year, samples were collected both at the source and at the microbial mats formed where the spring waters emerge. The number of total microorganisms determined was 10^5 /mL, most of which were alive (97,1%). The number of heterotrophic viable bacteria and sporulated bacilli was lower than 100 cfu/mL and 5 cfu/mL, respectively. The majority of the isolated heterotrophic bacteria strains was Gram-negative bacilli (56,0%), while Gram-positive bacilli (24,0%) and Gram-positive cocci (14,6%) were found in lower percentages. The main genera of Gram-negative bacilli identified were: *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Pseudomonas* and *Ochrobactrum*; while Gram-positive cocci belonged to the genus *Staphylococcus* and Gram-positive bacilli belonged to the genus *Bacillus*. Waters from San Camilo spring have shown greater microbial diversity than those from Cervantes spring. There were not detected faecal indicators neither were pathogenic microorganisms. On the other hand, proteolytic, amylolytic, and ammonifiers microorganisms were detected at a high number (10^4 /100 mL); sulphate-reducing bacteria at a medium number (10^2 /100 mL); cellulolytic and halophiles microorganisms and fungi were detected at a reduced number (lower than 20/100 mL). Finally, the analyzed microbial mats consist of an association of green algae (*Cosmarium*), diatoms, filamentous cyanobacteria (*Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*), sphaeric cyanobacteria (*Gloeocapsa*) and filamentous phototrophic bacteria.

Key words: Carbonated mineral springs.-Natural water.-Cervantes Spa.-Microbiology.

Respondió Sancho (...) he dormido en la dura tierra al cielo abierto (...) sustentándome con rajas de queso y mendrugos de pan y bebiendo aguas, ya de arroyos, ya de fuentes, de las que encontramos por esos andurriales donde andamos.

*El ingenioso hidalgo don Quijote de la Mancha
Parte II. Capítulo XXVIII.
Miguel de Cervantes*

INTRODUCCIÓN

El balneario Cervantes se encuentra ubicado en el término municipal de Santa Cruz de Mudela, al noroeste de la provincia de Ciudad Real, en un paraje denominado «El Salobral». Sus orígenes se remontan al siglo XVIII y en la actualidad se utilizan dos manantiales: «San Camilo», denominado antes «Villa Rosa» y «Cervantes», llamado antiguamente «de los agonizantes» que procede de un pozo de la mina Bilbao.

El manantial San Camilo se utiliza para agua de bebida mediante una fuente instalada en el parque que rodea al establecimiento del balneario. El agua emerge a una temperatura de 15,6°C, tiene un pH de 6,1 y se clasifica como bicarbonatada sódica, cálcica y carbogaseosa (1). El manantial Cervantes se usa para los tratamientos terapéuticos que se realizan en las instalaciones del balneario. La temperatura de emergencia del agua es de 17,5°C, el pH 6,6 y se clasifica como sulfatada, bicarbonatada, cálcica y magnésica (1). El primer análisis microbiológico de este manantial se realizó para gestionar el expediente de declaración de utilidad pública, por un organismo oficial de reconocido prestigio, como la Brigada Sanitaria de Ciudad Real (2).

El objeto del trabajo ha sido investigar la microbiota autóctona que tiene como hábitat las aguas de estos dos manantiales, con la finalidad de cuantificar y caracterizar su población. Los ecosistemas acuáticos por sus características específicas constituyen nichos ecológicos que favorecen el desarrollo de determinadas especies, el conocimiento de estos micro-hábitat nos ayudará a establecer la biología y la ecología de los mismos. El agua es un vehículo importante de transmisión de enfermedades, por lo cual también se han investigado los microorganismos patógenos que pudieran suponer un riesgo para la salud de los usuarios del balneario ya que el agua se utiliza en tratamientos terapéuticos tanto por vía oral como tópica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron muestras del agua en los puntos de emergencia de los dos manantiales, en los grifos de las bañeras, así como en la fuente de San Camilo. El manantial Cervantes tiene el punto de emergencia en la zona noreste del edificio balneario y se accede a éste por una entrada protegida del exterior por una tapa de hierro, situada sobre una superficie de obra a una altura de 1,5 metros del suelo (Figura 1). El agua se encuentra a una profundidad de 9-10 metros. Además de la muestra del pozo, se ha tomado otra a la salida de la conducción donde una bomba vierte el agua extraída del pozo en un antiguo aljibe, desde donde se distribuye a los baños. También se han tomado muestras del grifo de una de las bañeras.



FIGURA 1. *Manantial Cervantes. Punto de emergencia.*

El punto de emergencia del manantial San Camilo se encuentra situado a unos 500 metros del edificio del balneario dentro de una pequeña edificación rodeada por una tapia con una verja de hierro donde aún se puede leer el nombre antiguo del manantial «Villa Rosa». El brocal del pozo se encuentra protegido por una tapa de cristal, el agua se encuentra a una profundidad de 2 metros (Figura 2). La muestra se ha tomado en un grifo que hay junto al pozo. Desde este punto el agua se canaliza y se trata con radiaciones ultravioletas hasta una fuente clásica de chorro denominada de San Camilo, instalada en una edificación abierta en los jardines del balneario. La muestra de agua se ha tomado del grifo de la fuente.



FIGURA 2. Manantial San Camilo (izquierda) y punto de emergencia (derecha).

El muestreo se ha realizado en tres épocas del año: en otoño (17 de octubre de 2004), en invierno (8 de febrero de 2005) y en primavera (9 de mayo de 2005). En las tres ocasiones, se tomaron 2 muestras de agua de 1,5 litros, que se recogieron en recipientes estériles de plástico, los cuales se trasladaron a temperatura de refrigeración y en la oscuridad, al laboratorio, realizándose los análisis microbiológicos antes de las 24 horas.

Además se han tomado muestras de los tapetes microbianos que se desarrollan en la fuente de San Camilo, en la pared del vaso donde cae el agua y a la salida de la canalización del agua utilizada en los baños, que discurre al aire libre formando un pequeño riachuelo antes de verterse en un estanque.

Microorganismos totales y vivos

El recuento de microorganismos totales y vivos se ha realizado por la técnica de fluorescencia. Las muestras de agua se tiñeron durante 15 minutos con el «kit» de viabilidad bacteriana «BacLight Live/Dead» (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), compuesto de dos colorantes con afinidad a los ácidos nucleicos, SYTO 9 y yoduro de propidio. El SYTO 9 colorea todas las células de verde y el yoduro de propidio penetra en las células que tengan dañada su membrana, tiñéndolas de rojo (3). Después de teñir la muestra se filtró a través de un filtro Nucleopore de 0,2 μm y se observó con objetivo de inmersión en un microscopio de epifluorescencia (Nikon). Seguidamente se cuantificó el número de células verdes (vivas) y rojas (muertas) presentes, en al menos 10 campos del microscopio, y se calculó el número de microorganismos totales y vivos por mililitro de muestra (4).

Bacterias heterótrofas aerobias viables y esporuladas

El recuento de bacterias viables se ha realizado por dos técnicas: filtración y dilución en placa, en los medios, agar recuento en placa (PCA) (5) y agar R₂A (6). La incubación se ha realizado a 22° C durante 5 días y a 37° C durante dos días. Para el recuento de bacterias esporuladas se calentó la muestra a 80°C, 10 min, sembrando por las mismas técnicas y medios descritos anteriormente, adicionados con 0,1% de almidón e incubando a las mismas temperaturas. Los resultados se expresaron como medias aritméticas de las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) de agua.

Microorganismos de interés sanitario

Se han utilizado los métodos oficiales de las aguas de bebida envasadas (7). Los recuentos de coliformes totales, coliformes fecales y enterococos, se han realizado por las técnicas del número más probable (NMP/100 mL) y de filtración, filtrando 100 mL de agua. Las esporas de *Clostridium* sulfito-reductores y *C. perfringens* se han determinado por el método de dilución en tubo, inoculando 100 mL

de agua. Se ha investigado la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* filtrando 250 mL de agua. La detección de *Staphylococcus aureus* se ha realizado por la técnica de filtración, filtrando 250 mL de agua y depositando el filtro en caldo triptona soja y posteriormente aislando en agar Baird-Parker (5) e incubando a 37°C, de 24 a 48 horas. El estudio de *Legionella pneumophila* se ha hecho por la técnica de filtración descrita por Pelaz y Martin (8).

Microorganismos de interés ecológico

Las bacterias proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas, amonificantes, nitrificantes y sulfato-reductoras, se determinaron por la técnica del número más probable (NMP), utilizando los medios descritos por Pochon y Tardieux (9) y el medio de Starkey (10) para las últimas, e incubando a 30°C durante 30 días. Los recuentos se han expresado como NMP de microorganismos por 100 mL de agua.

Los recuentos de las bacterias halófilas moderadas, actinomicetos y los hongos se han realizado por la técnica de filtración, utilizando agar halófilo con 15 % de cloruro sódico (11), agar para actinomicetos (Difco) y agar Sabouraud con cloramfenicol al 0,05 % (5), respectivamente. Las bacterias se incubaron a 30°C durante 5-7 días y los hongos a 24° C, durante 7 días. Los resultados se han expresado como unidades formadoras de colonias (ufc) por 100 mililitros de agua.

La investigación de las bacterias del hierro se hizo en el medio Duchon-Miller (glucosa y sulfato ferroso 10 mg por litro) y las bacterias que oxidan el azufre en medios con tiosulfato (12,13), incubando a 30°C, durante 15 días.

Identificación de microorganismos

Las cepas de bacterias se han identificado por 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 movi-

lidad (14). Además los bacilos Gram negativos no fermentadores se inocularon en las galerías API 20NE (bioMérieux), los bacilos Gram negativos fermentadores en API 20E (bioMérieux), los bacilos Gram positivos no esporulados en API Coryne (bioMérieux) y los cocos Gram positivos en API Staph (bioMérieux).

Las cepas bacterianas aisladas se han clasificado siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (15, 16, 17) y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB), publicada en el *International Journal of Systematic Bacteriology*.

Los hongos filamentosos se han identificado por la morfología de las colonias y las observaciones microscópicas de las hifas, esporangios y esporas, siguiendo los criterios de Pitt y Hocking (18).

Tapetes Microbianos

El estudio microbiológico de los tapetes microbianos se ha realizado por técnicas microscópicas, utilizando microscopios de campo claro, campo oscuro, contraste de fases y fluorescencia (Nikon).

Además se ha realizado la investigación, por cultivo, de las bacterias del hierro y las que oxidan el azufre utilizando los medios y condiciones de cultivo descritos anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en las determinaciones microbiológicas de los tres muestreos efectuados en cada uno de los manantiales.

Microorganismos totales y vivos

El número de microorganismos totales fue semejante en los dos manantiales analizados, Cervantes y San Camilo, con un valor medio por mL de $4,4 \times 10^5$ y $3,2 \times 10^5$, estando la mayoría vivos 95,9 % y 98,3 %, respectivamente (Tabla 1). Estos resultados son similares a

los encontrados en otros manantiales de aguas minerales naturales (19) y mineromedicinales hipotermales (20, 21, 22).

TABLA 1. *Microorganismos totales y vivos (Nº/mL)*

<i>Microorganismos</i>	<i>Manantiales</i>	
	<i>Cervantes</i>	<i>San Camilo</i>
Totales	4,4 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵
Vivos	4,2 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵
%	95,9	98,3

Bacterias heterótrofas aerobias viables y esporuladas

En los puntos de emergencia de los dos manantiales, el número de bacterias heterótrofas y oligotróficas aerobias viables ha sido inferior a 100 ufc/mL (Tabla 2) y el de esporuladas inferior a 5 ufc/mL, lo que indica una buena protección de los manantiales. Estos valores son semejantes a los obtenidos en otros manantiales carbónicos (20) y bicarbonatados españoles (23). No se han observado diferencias en el número de bacterias obtenido en los distintos medios 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 (24).

El agua utilizada para los tratamientos terapéuticos tanto en baños como en bebida presenta un número muy bajo de bacterias.

El recuento de bacterias viables ha sido inferior en dos a tres unidades logarítmicas, al de microorganismos totales. La selectividad de los medios de cultivo y las condiciones de incubación para el crecimiento de los microorganismos presentes en esos manantiales, hace que solo una pequeña proporción de los que se encuentran en las aguas sean cultivables (25). Diversos autores señalan estas diferencias, en los recuentos, cuando se analizan distintos tipos de aguas (26,27).

TABLA 2. Número de bacterias heterótrofas aerobias viables (ufc/mL)

T ^a	Medio cultivo	Manantiales				Fuente
		P. emergencia Pozo	Cervantes Conducción	Baño	P.emergencia	
22°C	PCA	20	1	20	49	2
	R ₂ A	14	13	32	85	12
37°C	PCA	96	1	6	24	6
	R ₂ A	26	2	7	12	1

En la tabla 3 se muestra el porcentaje de cepas identificadas en los dos manantiales. Se han aislado 75 cepas de bacterias heterótrofas de las cuales se han identificado 71 que corresponden a: bacilos Gram negativos 42 (56,0 %), bacilos Gram positivos 18 (24,0 %) y cocos Gram positivos 11 (14,6 %). En los manantiales han predominado los bacilos Gram negativos, encontrándose especies fermentadoras y no fermentadoras, lo que es característico de aguas minerales hipotermas (24,28). El manantial San Camilo tiene una gran biodiversidad presentando un número de especies diferentes mayor que el manantial Cervantes.

En el manantial Cervantes se han aislado en mayor proporción cepas de bacilos no fermentadores, principalmente la especie *Burkholderia cepacia*. Este microorganismo es frecuente en aguas minerales ya que es muy ubicuo y necesita muy pocos nutrientes para su desarrollo (21, 23,29).

En el manantial San Camilo han predominado las especies fermentadoras, *Aeromonas hydrophila* y *Serratia marcescens*. La especie *A. hydrophila* forma parte de la micropoblación autóctona de las aguas y se aísla con frecuencia en manantiales de aguas minerales (23, 30) Lo mismo sucede con algunas especies de Enterobacterias, no coliformes, como *S. marcescens* y *S. liquefaciens* (31). También se ha aislado la especie *Escherichia vulneris*, coliforme de origen no fecal, que se ha encontrado en aguas de bebida y coloniza conducciones y depósitos refrigerados, debido a la producción de biopelículas (32). Entre las especies no fermentadoras detectadas en este manantial destaca *Ochrobactrum anthropi* que utiliza una gran variedad de compuestos orgánicos y se ha aislado en otros manantiales (23, 33).

TABLA 3. Géneros y especies de bacterias heterótrofas (% de cepas).

Bacterias	Manantiales	
	Cervantes (n° = 35)	San Camilo (n° = 40)
BACILOS GRAM -	54,4	57,5
Fermentadores	22,9	37,5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	—	12,5
<i>Citrobacter spp.</i>	—	2,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,7	—
<i>Proteus spp.</i>	—	2,5
<i>Providencia rettgeri</i>	5,7	—
<i>Serratia liquefaciens</i>	2,9	5,0
<i>Serratia marcescens</i>	8,6	10,0
<i>Escherichia vulneris</i>	—	2,5
<i>Enterobacter spp.</i>	—	2,5
No fermentadores	31,5	20,0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	—	5,0
<i>Burkholderia cepacia</i>	22,9	5,9
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	—	7,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,7	2,5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,9	—
BACILOS GRAM +	31,4	17,5
<i>Bacillus spp.</i>	11,4	5,0
<i>Clostridium spp.</i>	14,3	5,0
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	2,9	—
<i>Corynebacterium spp.</i>	—	7,5
<i>Rhodococcus spp.</i>	2,9	—
COCOS GRAM +	11,5	17,5
<i>Micrococcus spp.</i>	2,9	2,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	2,5
<i>Staphylococcus warneri</i>	—	2,5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	5,7	2,5
<i>Staphylococcus spp.</i>	2,9	7,5
No identificadas	2,9	7,5

También se han encontrado cepas de bacilos Gram positivos esporulados, de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* y bacilos irregulares no esporulados de los géneros *Corynebacterium* y *Rhodococcus* (Tabla 3). Estas bacterias pueden proceder del aire y del suelo de donde pasan al agua y han sido aislados en aguas minerales naturales por diversos autores (21, 23, 24, 34).

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción en ambos manantiales y corresponden en su mayoría al género *Staphylococcus*. Estas bacterias están en el ambiente y pueden llegar a los manantiales a través del aire, el suelo y la lluvia (24) Otros investigadores han señalado su presencia en aguas minerales naturales y mineromedicinales (21, 22, 23, 34).

Microorganismos de interés sanitario

En los análisis realizados, tanto en los puntos de emergencia de los manantiales como en los baños y agua de bebida de la fuente de San Camilo, no se encontraron indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium perfringens*) en 100 mL de agua, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano (35). En ninguna muestra se han detectado bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua.

Se han detectado coliformes totales y esporas de *Clostridium* sulfito-reductores, en número muy bajo, menos de 10/100 mL de agua, en los puntos de emergencia de los dos manantiales. Estos microorganismos no se consideran indicadores de contaminación fecal en las últimas normativas de las aguas de bebida (35, 36), debido a que proceden del suelo y desde éste pueden pasar a las aguas subterráneas.

Microorganismos de interés ecológico

Las comunidades microbianas autóctonas de las aguas naturales participan en los ciclos biogeológicos transformando los com-

puestos para proveer de nutrientes a otros organismos de la comunidad lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio biológico en el ecosistema, además estas actividades les permiten llevar a cabo una autodepuración de posibles contaminantes orgánicos (24).

En el punto de emergencia del manantial Cervantes se han detectado bacterias proteolíticas, amilolíticas y amonificantes en número alto ($10^4/100$ mL) y sulfato reductoras en número medio ($10^2/100$ mL) (Tabla 4). En el manantial San Camilo también se han detectado bacterias proteolíticas en número alto, mientras que las bacterias amilolíticas y sulfato-reductoras se han encontrado en número medio y las amonificantes en número bajo. En ambos manantiales los microorganismos celulolíticos y halófilos están en número inferior a $10/100$ mL.

TABLA 4. Número de microorganismos de interés ecológico.

Microorganismos	Manantiales	
	Cervantes	San Camilo
NMP/100 mL		
Proteolíticos	$2,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
Amilolíticos	$2,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^2$
Amonificantes	$2,4 \times 10^4$	3,6
Celulolíticos	3,0	3,0
Sulfato reductores	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$
ufc/100 mL		
Halófilos	10,0	5,0
Hongos	14,0	19,0

Las bacterias proteolíticas y amilolíticas aisladas de estos manantiales pertenecen, principalmente, a los géneros *Burkholderia*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Bacillus*. En aguas dulces se ha encontrado que un número alto de bacterias que hidrolizan la gelatina indica una buena calidad del agua (37). Estas bacterias corresponden a bacilos aerobios Gram negativos y Gram positivos esporulados, lo que está de acuerdo con nuestros resultados. Las bacterias amilolíticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y corresponden a especies

mesófilas y termófilas muy diversas (38). Esta diversidad se ha encontrado en manantiales mineromedicinales hipo, meso e hipertermales españoles (23, 39, 40).

Las bacterias amonificantes aisladas en estas aguas son bacilos Gram negativos de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Estas bacterias del ciclo del nitrógeno son esenciales en los hábitats acuáticos ya que degradan la materia orgánica (41).

Las bacterias sulfato-reductoras pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Desulfococcus*. Estas bacterias que intervienen en el ciclo del azufre, son frecuentes en manantiales ricos en sulfatos y sulfuros (40, 42).

En estos manantiales se han identificado bacterias halófilas facultativas del género *Staphylococcus* que también han sido descritas en otros manantiales hipotermas (21,22, 39).

En ambos manantiales no se detectaron bacterias nitrificantes, oxidantes del azufre, del hierro ni actinomicetos.

Se han aislado hongos filamentosos en un número muy pequeño (<20/100 mL) que pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor* y *Aureobasidium* (Tabla 4). Los hongos son microorganismos muy ubicuos pero en aguas subterráneas están en número bajo o no se detectan (24), sin embargo, diversos autores los han encontrado en manantiales de aguas hipotermas (22, 39), en aguas minerales envasadas (43) y en aguas subterráneas de consumo público (44). Algunos de estos géneros han sido aislados en manantiales mineromedicinales españoles (23,40).

Los microorganismos celulolíticos detectados corresponden a mohos de los géneros *Mucor* y *Acremonium*. La capacidad de degradar la celulosa por enzimas extracelulares la poseen muchas especies de mohos (45) como los encontrados en estas aguas.

Tapetes microbianos

En ambientes acuáticos es frecuente la formación de biotapetes adheridos a superficies que también se han encontrado en manantiales minerales de aguas frías (21) y termas (40, 46). Están forma-

dos por comunidades microbianas complejas, dependiendo de las características físico-químicas ambientales (luz, oxígeno, temperatura, pH y composición química del agua). Estos tapetes están formados por asociaciones entre microorganismos filamentosos (algas y cianobacterias) entrettejidos y otros organismos unicelulares (diatomeas, algas verdes, protozoos y bacterias) ya que de esta forma se favorece el aporte de nutrientes.

El tapete microbiano epilítico que se desarrolla en la fuente de San Camilo, es de color verde oscuro y marrón terroso en la parte inferior, gelatinoso y de consistencia media (Figura 5). Está compuesto por una gran diversidad de diatomeas (*Navicula*, *Fragilaria*, *Cymbella*), cianobacterias filamentosas tipo *Oscillatoria* y esféricas como *Gloeocapsa*. En menor proporción se encuentran algas verdes unicelulares esféricas (*Chlorococccum*) y tetraédricas (Figura 3 y 4).

El tapete del manantial Cervantes está constituido por tres capas y tiene una estructura consistente. La capa superior es de color verde, la intermedia marrón y la inferior negra. La parte superior esta formada por algas verdes, tipo *Cosmarium* y diatomeas, de distintas morfologías, así como cianobacterias filamentosas (*Oscillatoria* y *Pseudanabaena*) y bacterias fototrofas filamentosas (*Chloroflexus*) (Figura 5). En la zona intermedia marrón disminuyen las

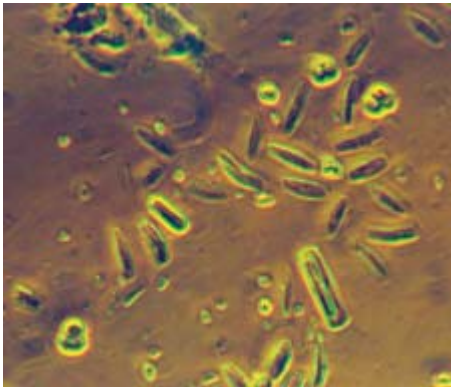


FIGURA 3. Diatomeas, *Chlorococccum* y *Gloeocapsa*. Observaciones por microscopía de contraste de fases. Objetivo 20X.

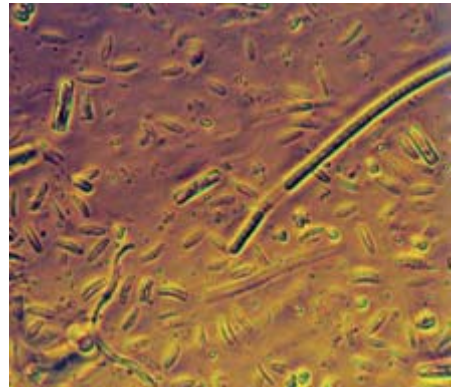


FIGURA 4. Diatomeas y *Oscillatoria*. Observaciones por microscopía de contraste de fases. Objetivo 20X.

algas verdes y aparecen cianobacterias en forma de espiral (*Spirulina*) y en cadenas de células esféricas (*Nostoc*) (Figura 6). En la zona inferior se observan cianobacterias filamentosas (*Pseudanabaena*) junto con un gran número de las bacterias que reducen los sulfatos.

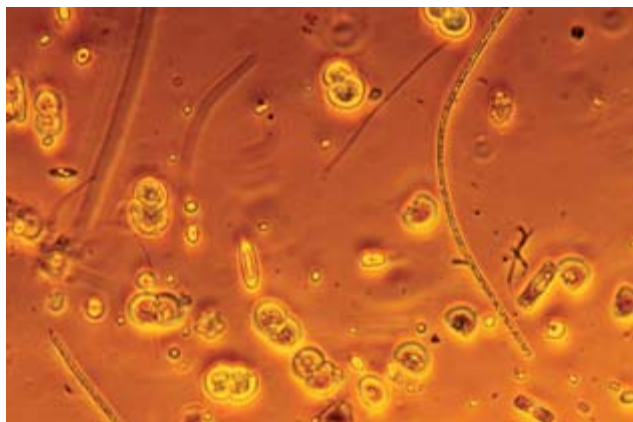


FIGURA 5. Algas verdes (*Cosmarium*), diatomeas y cianobacterias. Observaciones por microscopía de contraste de fases. Objetivo 20X.



FIGURA 6. Cianobacterias (*Spirulina*). Observaciones por microscopía de contraste de fases. Objetivo 40X.

Las algas conjugadas tipo *Cosmarium* y las diatomeas están ampliamente distribuidas en las aguas dulces donde juegan un importante papel en la cadena trófica ya que forman parte del plancton (47). Las cianobacterias *Spirulina* y *Pseudanabaena* se encuentran en la zona inferior del tapete, en condiciones anóxicas, donde las bacterias sulfato reductoras producen sulfhídrico que favorece su desarrollo (48).

En el cultivo de ambos tapetes en medios con tiosulfato sódico se han detectado unas bacterias de gran tamaño y forma irregular que forman agregados, debido a la producción de un polisacárido. También se han encontrado bacterias filamentosas que oxidan el azufre (*Thiothrix*) al igual que en otros manantiales minerales (21). En el cultivo de las bacterias del hierro se han observado bacterias fila-

mentos que forman precipitados de óxidos y sulfuros de hierro y manganeso (*Sphaerotilus* y *Leptothrix*) (Figuras 7 y 8).

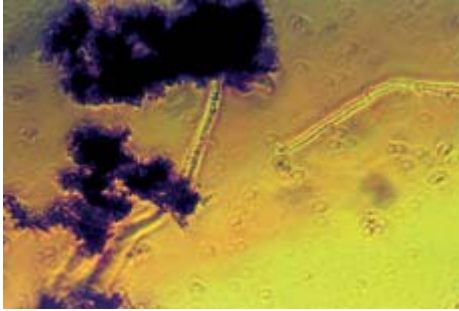


FIGURA 7. Bacterias del hierro (*Sphaerotilus*). Observaciones por microscopía de contraste de fases. Objetivo 20X.

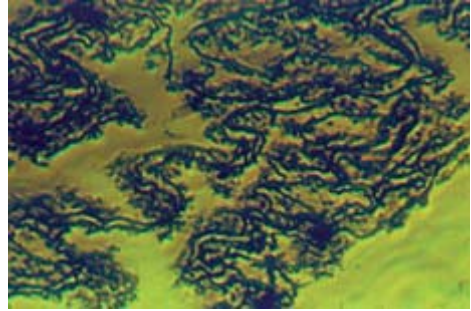


FIGURA 8. Bacterias del hierro (*Leptothrix*). Observaciones por microscopía de contraste de fases. Objetivo 20X.

CONCLUSIONES

Los manantiales Cervantes y San Camilo presentan un número bajo de bacterias viables y esporuladas, lo que indica un correcto perímetro de protección. Desde el punto de vista sanitario, no contiene indicadores fecales ni microorganismos patógenos por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. La micro-población autóctona está constituida principalmente por bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores, característica de manantiales hipotermales. El manantial San Camilo presenta una mayor diversidad microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANÓNIMO (2004) Vademécum de las aguas mineromedicinales españolas. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
- (2) ANÓNIMO (1929) Gaceta de Madrid 171, 20 de junio de 1929. Pag: 1167.
- (3) RAMALHO, R.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P. AND GIBBS, P. (2001) Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *J. Microbiol. Method.* 44: 97-103.
- (4) BOULOS, L. ; PRÉVOST, M. ; BARBEAU, B. ; COALLIER, J. AND DESJARDINS, R. (1999) LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct

- enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Method.* 37: 77-86.
- (5) ANÓNIMO (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater 20th edition. American Public Health Association. Washington.
 - (6) REASONER, D.J. AND GELDREICH, E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7.
 - (7) ANÓNIMO (1987) Orden de 8 de mayo de 1987. Métodos oficiales de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. *BOE* 114: 13964-13973.
 - (8) PELAZ, C. Y MARTIN, C. (1993) Legionelosis. Datos de España, diagnóstico de laboratorio y control en instalaciones de edificios. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
 - (9) POCHON, J. ET TARDIEUX, P. (1956) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle. St. Mandé (Seine).
 - (10) RODINA, A.G. (1972) Methods in aquatic microbiology. University Park Press. Baltimore.
 - (11) ANÓNIMO (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 14th edition. American Public Health Association. Washington.
 - (12) STANIER, R.; ADELBERG, E. AND INGRAHAM, J. (1984) Microbiología. Reverté. Barcelona.
 - (13) DAS, S.K.; MISHR, A.K.; TINDALL, B.J.; RAINEY, F.A. AND STACKEBRANDT, E. (1996) Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosae thiooxidans* (strain BI-42) gen. Nov., sp. Nov.: Analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 981-987.
 - (14) BARROW, G.I. AND FELTHAM, R.K.A. (1993) Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. Cambridge.
 - (15) KRIEG, R. AND HOLT, G. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. Williams & Wilkins. Baltimore.
 - (16) SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHAPE, M. AND HOLT, J. (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. Williams & Wilkins. Baltimore.
 - (17) HOLT, J.G.; KRIEG, N.; SNEATH, D.; SLALEY, J. AND WILLIAMS, S. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore.
 - (18) PITT, J.L. AND HOCKING, A.D. (1997) Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional. London.
 - (19) URMENETA, J.; NAVARRETE, A. AND SANCHO, J. (2000) Isolation and identification of autochthonous microbiota from a granitic aquifer and its variation after the bottling process. *Current Microbiol.* 41: 379-383.
 - (20) MOSSO, M.A.; DE LA ROSA, M.C.; DÍAZ, F.; VIVAR, C. Y MEDINA, M.R. (1990) Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales de Alange. Monografía n° 16. Real Academia de Farmacia. Pag: 28-40.
 - (21) DE LA ROSA, M.C.; MOSSO, M.A.; PRIETO, M.P. Y ULLÁN, C. (1999) Microbiología del manantial mineromedicinal de Carratraca. *Anal. Real Acad. Farm.* 65: 439-456.
 - (22) DE LA ROSA, M.C.; MOSSO, M.A. Y PRIETO, M.P. (2001) Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario «El Paraíso» de Manzanera (Teruel). *Anal. Real Acad. Farm.* 67: 173-183.

- (23) DE LA ROSA, M.C.; ANDUEZA, F.; SANCHEZ, M.C.; RODRÍGUEZ, C. Y MOSSO, M.C. (2004) Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 70: 521-542.
- (24) LECLERC, H. AND MOREAU, A. (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 207-222.
- (25) BYRD, J.J.; XU, H.S. AND COLWELL, R.R. (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 875-878.
- (26) GASOL, J.M.; ZWEIFEL, U.; PETERS, F.; FUHRMAN, J.A. AND HAGSTRÖM, A. (1999) Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4475-4483
- (27) LEPEUPLE, A.S.; GILOUPPE, S.; PIERLOT, E. AND DE ROUBIN, M.R. (2004) Rapid and automated detection of fluorescent total bacteria in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 327-332.
- (28) MOSSO, M.A.; DE LA ROSA, M.C.; VIVAR, C. AND MEDINA, M.R. (1994) Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters termal springs in Spain. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 370-381.
- (29) ZANETTI, F.; DE LUCA, G. AND STAMPI, S. (2000) Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 67-72.
- (30) CROCI, L.; DI PASQUALE, S.; CROZZI, L. AND TOTI, L. (2001) Behavior of *Aeromonas hydrophila* in bottled mineral waters. *J. Food Prot.* 64: 1836-1840.
- (31) SCHINDLER, P.R. (1994) Enterobacteria in mineral, spring and table water. *Gesundheitswesen* 56: 690-693.
- (32) LE QUERLER, L.; DONNIO, P.Y.; POISSON, M.; ROUZET-GRAS, S. AND AVRIL, J.L. (1997) Isolation of *Escherichia vulneris* in drinking water. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 55: 33-35.
- (33) HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN AND KERSTERS, K. (1988) *Ochrobactrum anthropi* ge, nov., sp. Nov. From clinical specimens and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 406-416.
- (34) MAVRIDOU, A. (1992) Study of the bacterial flora of non-carbonated natural mineral water. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 355-361.
- (35) ANÓNIMO (2003) Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero sobre Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *BOE* 45: 7228-7245.
- (36) ANÓNIMO (1998) Directiva del Consejo 98/83/CE de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas de consumo humano. *DOCE L* 330: 32-54.
- (37) STILINOVIC, B. AND HRENOVIC, J. (2004) Percentage of gelatinolytic bacteria among heterotrophic bacteria as indicator of water quality. *Folia Microbiol.* 49: 53-58.
- (38) JONES, R.A.; JERMIIN, L.S.; EASTEAL, S.; PATEL, B.K. AND BEACHAM, I.R. (1999) Amylase and 16S rRNA genes from a hyperthermophilic archaeobacterium. *J. Appl. Microbiol.* 86:93-107.
- (39) MOSSO, M.A.; DE LA ROSA, M.C. Y VIVAR C. (1998) Microbiología del manantial hervideros del balneario de Cofrentes. *Anal. Real Acad. Farm.* 64: 53-63.
- (40) MOSSO, M.A.; SÁNCHEZ, M. Y DE LA ROSA, M.C. (2002) Microbiología del agua mineromedicinal de los balnearios de Alhama de Granada. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 68: 381-405.

- (41) WARD, B.B. (1996) Nitrification and ammonification in aquatic systems. *Life Support Biosph. Sci.* 3: 25-29.
- (42) EL SHAHED, M.S.; SENKO, J.M.; NAJAR, F.Z.; KENTON, S.M.; ROE, B.A.; DEWERS, T.A.; SPEAR, J.R. AND KRUMHOLZ, L.R. (2003) Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-spring. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5609-5621.
- (43) CABRAL, D. AND FERNÁNDEZ, P. (2002) Fungal spoilage of bottled mineral water. *J. Food Microbiol.* 30: 73-76.
- (44) GOTTLICH, E.; VAN DER LUBBE, W.; LANGE, B.; FIEDLER, S.; MELCHERT, I.; REIFENRATH, M.; FLEMING, H.C.; AND DE HOOG, S. (2002) Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205: 269-279.
- (45) ENARI, T.M. (1983) Microbial Cellulases. En *Microbial enzymes and biotechnology*. Ed. W.M. Fogarty. Applied Science Publishers. London.
- (46) SKIRNISDOTTIR, S. ; HREGGIDSSON, G.O. ; HJORLEIFSDOTTIR, S.; MARTEINSSON, V.T.; PETURDOTTIR, S.K.; HOLST, O. AND KRISSTJANSSON, J.K. (2000) Influence of sulfite and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2835-2841.
- (47) STREBLE, H. AND KRAUTER, D. (1987) Atlas de los microorganismos de agua dulce. Omega. Barcelona.
- (48) CASTENHOLZ, R.W. (2001) Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic bacteria. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, Vol. I, Boone, D.R. and Castenholz, R.W. Springer. New York.