

CAPÍTULO III

Análisis de la radiactividad en aguas del Balneario de Valdeleiteja

HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.; SUÁÑEZ FIDALGO, A. M.;
GASCÓ LEONARTE, C.; ROMERO DEL HOMBREBUENO
POZUELO, B.; TRINIDAD RUIZ, J. A.; GARCÍA SANZ, R.
y SIMÓN ARAUZO, M. A.

*Departamento de Medio Ambiente (CIEMAT)
Avda. Complutense, 22 - 28040 Madrid*

RESUMEN

Se ha realizado el estudio radiológico del agua del manantial del Balneario de Valdeleiteja. Este estudio ha consistido en la determinación cuantitativa de los radionucleidos naturales más importantes desde el punto de vista de la protección radiológica existentes en el agua del balneario.

La medida del contenido radiactivo del agua constituye un tema cuyo estudio resulta de gran interés. Las aguas con elementos radiactivos disueltos pueden producir, como consecuencia directa de su consumo, dosis de irradiación interna tanto por ingestión como por inhalación de estos elementos. Debido a esto es necesario, en algunos casos, proceder al análisis y posterior evaluación de la dosis asociada a este consumo.

Palabras clave: Radiactividad.—Radionucleido.—Periodo de semidesintegración.—Series radiactivas.

ABSTRACT

Radioactivity analysis of Valdeleiteja Spa waters

Radioactivity analysis of Valdeleiteja Spa water was carried out by the CIEMAT Laboratory of Environmental Radioactivity. With this aim the most important natural radionuclides were determined in water.

The measurement and knowledge of radioactivity level in water is an interesting and convenient topic. The consumption of water which has dissolved some radionuclides could lead to internal irradiation both by ingestion and by inhalation. Therefore it is necessary, in some cases, to determine the water radioactivity level in order to assess the dose.

Key words: Radioactivity.—Radionuclides.—Half live.—Radioactive series.

INTRODUCCIÓN

La Unidad de Radiactividad Ambiental y Vigilancia Radiológica del Departamento de Medio Ambiente del CIEMAT ha realizado un estudio de la radiactividad en el agua de uno de los dos manantiales del Balneario de Valdelateja. Este trabajo está englobado dentro de un estudio más amplio sobre las características generales de los balnearios españoles en el que se incluye las características radiológicas de sus aguas mineromedicinales.

Las aguas subterráneas que circulan por la corteza terrestre constituyen agentes fundamentales en los procesos geológicos de formación. Siendo un solvente natural complejo y dinámico, el agua participa tanto en los procesos de disolución y transporte como en las reacciones químicas y en la transferencia de calor, gases y elementos químicos. Como consecuencia de ello es el principal medio de dispersión y transporte de los elementos radiactivos naturales a través de la biosfera y de los niveles tróficos hasta alcanzar al hombre.

ANÁLISIS DE RADIATIVIDAD

Los isótopos radiactivos que habitualmente se encuentran presentes en el agua, excepción hecha del K-40, proceden de las series radiactivas naturales de los radionucleidos primarios U-238, U-235 y Th-232, que se encuentran distribuidos abundantemente, aunque de forma desigual, en la corteza terrestre.

Estos radionucleidos cabeza de las series radiactivas son denominados radionucleidos primogénicos, ya que proceden de los primitivos materiales que se acumularon en la formación de la tierra, y por sus largos periodos de semidesintegración están aún presentes. La

mayor parte de los otros radionucleidos miembros de las series son de periodos más cortos y se están produciendo continuamente por la desintegración de sus precursores, de periodos largos.

La mayor o menor concentración de estos radionucleidos en las aguas viene condicionada no sólo por la mayor abundancia en el terreno, sino también por las características físico-químicas de cada uno de ellos (solubilidad, etc.). Ello hace que los equilibrios radiactivos seculares entre los radionucleidos existentes en los terrenos se alteren radicalmente en las aguas que los disuelven y acumulan. Un caso típico es el Rn-222, cuya actividad en agua suele ser mucho mayor que la de su progenitor el Ra-226, de características físico-químicas distintas, a pesar de su periodo de semidesintegración mucho más corto.

ÍNDICES DE ACTIVIDAD TOTAL

Una estimación del contenido de la radiactividad en el agua nos la proporcionan los llamados índices de radiactividad alfa total y beta total, cuya medida es simple y rápida y que nos permite decidir sobre la necesidad de realizar determinaciones cuantitativas e individualizadas de los posibles radionucleidos presentes.

Estas medidas son, como su nombre indica, unos índices y por tanto proporcionan unos valores orientativos, los cuales se expresan refiriendo toda la actividad alfa como si fuera Am-241 y la actividad beta como Sr-90 en equilibrio con el Y-90.

La determinación de los citados índices se ha realizado siguiendo los procedimientos normalizados en el laboratorio (1, 2).

Los equipos utilizados han sido un contador de centelleo de sulfuro de cinc (Ag), modelo 2007P de la firma «Canberra», para la medida de la actividad alfa, y un contador proporcional de flujo de gas, modelo Berthold 6B-770/2, para la medida de la actividad beta.

DETERMINACIÓN DE RADIONUCLEIDOS

La selección de los radionucleidos a determinar se ha basado fundamentalmente en criterios de peligrosidad radiológica, según su

contribución a las dosis del hombre por ingestión o inhalación. Siguiendo este criterio se ha elegido, en primer lugar, el Rn-222 y su progenitor el Ra-226, que son los principales contribuyentes de la radiactividad de la serie del U-238, debido a sus descendientes de periodo de semidesintegración corto, con los cuales alcanza rápidamente el equilibrio. Los restantes radionucleidos seleccionados han sido fundamentalmente aquellos de periodo de semidesintegración largo, que son los únicos que se pueden determinar en la práctica, aunque se haya roto el equilibrio radiactivo entre los diferentes radionucleidos de la serie.

Los radionucleidos seleccionados han sido los siguientes:

Rn-222

En general, el mayor porcentaje de radiactividad de las aguas subterráneas se debe a la presencia de Rn-222. Debido a sus propiedades físico-químicas se produce una acumulación de radón en el agua que da lugar a valores de actividad muy superior a la debida al simple equilibrio radiactivo con su progenitor. Por otra parte, la presencia de Rn-222 juega un papel primordial en la actividad total de las aguas, no sólo por su propia radiactividad, sino porque es el precursor de una serie de radionucleidos de periodos de semidesintegración cortos, tales como el Pb-214 ($T_{1/2} = 26,8$ minutos) y Bi-214 ($T_{1/2} = 19,8$ minutos), que contribuyen en gran medida a los valores de actividad encontrada en las aguas.

El Rn-222 pertenece a la serie radiactiva del U-238, forma parte de los gases nobles, grupo de elementos químicos de muy poca reactividad química, por lo que su disolución y arrastre por el agua se realiza mediante procesos físicos.

Los métodos de medida *in situ* en el propio manantial son menos sensibles y precisos que los métodos de determinación de radón en el laboratorio, que es como se han realizado. Para ello se requiere una toma de muestra de agua en el balneario sin pérdidas de radón, utilizando para la misma un recipiente herméticamente cerrado.

La determinación del Rn-222 se realiza por medida directa mediante la técnica de espectrometría gamma del envase que contiene

la muestra. El cálculo de la actividad se realiza sobre los fotopicos del Pb-214 y Bi-214, en equilibrio con el Rn-222 (3). El equipo utilizado es un detector de germanio con su correspondiente cadena electrónica asociada. El detector está rodeado con un blindaje de hierro de 15 cm de espesor para reducir el fondo.

El envase utilizado para la toma de muestra, transporte y medida directa de la actividad ha sido tipo «Marinelli», con el que se obtiene un máximo de sensibilidad analítica.

Ra-226

El Ra-226 es un radionucleido emisor alfa con un periodo de semi-desintegración $T_{1/2} = 1.600$ años y es el precursor del Rn-222. Su determinación en agua se realiza según el procedimiento normalizado (4) mediante una separación radioquímica del radio utilizando portador de bario. Las medidas se realizan con un detector de sulfuro de cinc a distintos intervalos de tiempo a partir del momento de separación y mediante el planteamiento y resolución de un sistema de ecuaciones simultáneas se obtienen las actividades de Ra-226 y Ra-224.

U-238, U-235, U-234

Los isótopos de uranio se han determinado utilizando la técnica de espectrometría alfa, previa separación radioquímica y deposición electrolítica sobre un disco de acero inoxidable, utilizando como patrón interno el U-232 (5).

Th-230, Th-232, Th-228

Los isótopos de torio se han determinado por la espectrometría alfa (6), previa separación radioquímica y utilizando como patrón interno el Th-229.

El Th-230 pertenece a la serie radiactiva natural del U-238 y tiene un periodo de semidesintegración $T_{1/2} = 80.000$ años. Su determinación es muy importante por tratarse de un radionucleido muy res-

trictivo desde el punto de vista de protección radiológica, dado que es un emisor alfa con un periodo de semidesintegración muy largo.

Pb-210

El Pb-210 es un emisor beta con un periodo de semidesintegración $T_{1/2} = 22$ años. Su determinación se realiza previa separación radioquímica del mismo y posterior medida, transcurrido un mes, cuando alcanza el equilibrio con su descendiente el Bi-210, en un contador proporcional de flujo de gas (7).

Po-210

El Po-210 es un radionucleido emisor alfa con un periodo de semidesintegración $T_{1/2} = 138,38$ días. Es descendiente directo del Pb-210 y Bi-210, que a su vez provienen de la cadena de desintegración del Rn-222. Su determinación en agua se realiza según el procedimiento normalizado (10) mediante un auto-depósito sobre disco de plata en medio reductor, citrato sódico y bismuto en baño de agua termostatzado (90° C). El rendimiento químico del procedimiento se determina por medio de un trazador de Po-209. La medida se realiza mediante espectrometría alfa de alta sensibilidad y bajo fondo con detector de Si implantado.

H-3

El tritio es el único isótopo radiactivo del hidrógeno con un periodo de semidesintegración de 4.500 días, es un emisor beta con una energía máxima de 18,6 keV, por lo que su medida puede realizarse mediante contadores de centelleo líquido. Pero cuando la concentración es muy baja, como en las aguas naturales, es necesario realizar un enriquecimiento electrolítico previo de las muestras (9).

K-40

El K-40 es un emisor beta-gamma con un periodo de semidesintegración $T_{1/2} = 1.28E + 09$ años. Su determinación se realiza por espectrometría gamma (3) a partir del fotopico de 1460 keV.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la concentración obtenida para los diferentes radionucleidos, expresados como actividad en Becquerelios/litro y su incertidumbre asociada para un factor de cobertura $k = 2$.

TABLA 1. *Resultados del estudio radiológico del agua del Balneario de Valdelateja*

<i>Tipo de análisis</i>	<i>Actividad Bq/l</i>
ALFA TOTAL	0,189 ± 0,05
BETA TOTAL	0,231 ± 0,014
Ra-226	0,062 ± 0,012
Rn-222	7,3E+00 ± 4,9E+00
Th-232	1,8E-02 ± 6,5E-03
Th-230	3,1E-02 ± 1,1E-02
Th-228	2,1E-02 ± 7,0E-03
U-238	1,0E-03 ± 4,0E-04
U-234	3,6E-03 ± 7,3E-03
U-235	<2,1E-04
Pb-210	<1,1E-02
K-40	<1,5E+00
Po-210	1,8E-03 ± 5,7E-04
H-3	< 9,8E-02

CONCLUSIONES

Todos los radionucleidos que han sido determinados en las aguas por encima de los límites de detección son naturales y pertenecientes a las series radiactivas del U-238, U-235 y Th-232.

Aunque se ha detectado la presencia de Rn-222 en las aguas, su actividad es baja, inferior a los valores habituales encontrados en aguas subterráneas, tanto en España como en otros países.

La escasa actividad detectada es fundamentalmente debida al Ra-226, así como otros miembros de la serie radiactiva natural del U-238.

El valor encontrado para el índice de actividad alfa total supera ligeramente el mencionado como nivel guía en el *BOE* del 21 de febrero de 2003 para aguas potables.

El Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero de 2003, publicado el 21 de febrero en el *BOE* sobre la calidad del agua para consumo humano no aplica a aguas naturales minero-medicinales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Procedimiento para la determinación de la actividad alfa total en muestras de agua por precipitación. Procedimiento específico CIEMAT, PE-IA-LRA-08.
- (2) Procedimiento para la determinación de actividad beta total en muestras ambientales de diversa naturaleza. Procedimiento específico UNE 73311-4.
- (3) Procedimiento de determinación de emisores gamma en muestras ambientales. Procedimiento específico CIEMAT, PE-IA-LRA-07.
- (4) Procedimiento para la determinación de Ra-226 y Ra-224 en aguas mediante separación radioquímica. Procedimiento específico CIEMAT, PR-X2-04.
- (5) Procedimiento para la separación radioquímica y determinación mediante espectrometría alfa de uranio en aguas. Procedimiento específico CIEMAT, PR-X2-09.
- (6) Procedimiento para la determinación de Th-230 en aguas. Procedimiento específico CIEMAT, PE-IA-LRA-09.
- (7) Procedimiento para la determinación de Pb-210 en aguas. Procedimiento específico CIEMAT, PR-X2-05.
- (8) Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero de 2003, *BOE* de 21 de febrero de 2003. «Calidad del agua para consumo humano».
- (9) Procedimiento para la determinación de tritio en aguas por centelleo líquido con concentración electrolítica previa. CIEMAT, PT-IA/RA-CL01.
- (10) Determinación de ^{210}Po y ^{210}Pb en agua potable. Procedimiento CIEMAT PT-IA/RA-TR-6. CIEMAT. Madrid, 2006.

CAPÍTULO IV

Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja

MOSSO ROMEO, M.^a A.; SÁNCHEZ BELTRÁN, M.^a C.;
PINTADO GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C. y
DE LA ROSA JORGE, M.^a C.

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

RESUMEN

Se han estudiado los manantiales mineromedicinales, Termas y Río, del Balneario de Valdelateja (Burgos). El agua tiene un número de microorganismos totales de 13 y $2,9 \times 10^4$ /mL, respectivamente, estando la mayoría vivos (80,7 y 82,6%). El número de bacterias heterótrofas y oligotrofas viables y esporuladas a 22° C y 37° C ha sido inferior a 100 ufc/mL, siendo menor en el manantial Termas y corresponden, en su mayoría, a bacilos Gram negativos fermentadores (45,6%) y no fermentadores (31,6%) de la clase *Gammaproteobacteria* (60,6%) y, en menor proporción, a bacilos y cocos Gram positivos (22,8%). Las principales especies han sido: *Aeromonas hydrophila* en el manantial Río, y *Burkholderia cepacia* en el manantial Termas. No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos y tampoco actinomicetos, halófilos ni bacterias sulfato-reductoras. Se han detectado microorganismos amonificantes, proteolíticos, amilolíticos, celulolíticos y nitrificantes, cianobacterias, algas y hongos.

Palabras clave: Manantiales termales.—Balneario de Valdelateja.—Microbiota autóctona.—Biodiversidad.

ABSTRACT

Microbiology of the mineral spring of Valdelajeta Spa

Two mineral springs, named Termas and Río, have been studied in the Spa Valdelateja (Burgos). The number of total microorganisms present in the water

was of 13 and 2.9×10^4 /mL respectively, being the majority alive (80.7 and 82.6%). The number of the viable heterotrophic and oligotrophic bacteria and the sporulated bacteria, at 22 °C and 37 °C, in the Río spring, was lower than 100 cfu/mL; that number was even lower in the Termas spring. The strains of the heterotrophic bacteria isolated predominantly correspond to fermenters (45.6%) and non-fermenters (31.6%) Gram-negative bacilli, mainly belonging to the Class *Gammaproteobacteria* (60.6%) and in a smaller proportion to Gram-positive bacilli and cocci (22.8%). The most commonly identified species were: *Aeromonas hydrophila* in the Río spring, and *Burkholderia cepacia* in the Termas spring. Neither faecal indicators, pathogenic microorganisms, sulphate-reducing bacteria, halophilic bacteria nor actinomycetes were founded. On the other hand, ammonifying, proteolytic, amylolytic, cellulolytic and nitrifying bacteria as well as cyanobacteria, algae and fungi were detected.

Key words: Thermal springs.—Valdelateja Spa.—Autochtona microbiota.—Biodiversity.

INTRODUCCIÓN

El balneario de Valdelateja se encuentra ubicado en el término municipal del mismo nombre en la provincia de Burgos, donde confluyen los cañones de los ríos Ebro y Rudrón, en el valle de Sedano (Figura 1). Sus orígenes se remontan al siglo XIX, siendo declaradas sus aguas de utilidad pública en 1887 (1).

Este Balneario utiliza en sus instalaciones terapéuticas dos manantiales mineromedicinales denominados Termas y Río. El punto de emergencia del manantial Termas surge en la margen izquierda del río Rudrón y se encuentra debajo de la galería de baños, en el interior del edificio del Balneario (Figura 2). El manantial Río emerge directamente en el suelo, en la margen derecha del río, en un paraje con abundante vegetación. Actualmente, está protegido con una cubierta impermeable y rodeado de una valla metálica para evitar el acceso de personas y animales (Figura 3). Desde los puntos de emergencia el agua se canaliza hasta una pequeña edificación donde se encuentran las arquetas de mezclas y desde allí se elevan a un depósito y se conducen a las instalaciones balnearias para su empleo en los diversos tratamientos terapéuticos. El agua emerge a una temperatura de 19° C, tiene un pH 7,3 y se clasifica como hipotermal, de mineralización media, bicarbonatada y cálcica.



FIGURA 1. *Edificios del Balneario. Fachadas principal y posterior.*

Estas aguas mineromedicinales se utilizan en los tratamientos terapéuticos del balneario, principalmente por vía tópica, por lo que su calidad sanitaria es de gran importancia para la salud de los agüistas. Uno de los objetivos del trabajo ha sido investigar la presencia de los microorganismos de interés sanitario: indicadores de contaminación fecal y bacterias patógenas que se transmiten a través del agua. Pero no hay que olvidar que las aguas mineromedicinales son ecosistemas con unas características físicas y químicas específicas, en los que se forman micro-hábitats donde se favorece el desarrollo de determinadas especies microbianas, por lo que su conocimiento nos ayudará a establecer la biología y la ecología de los mismos. Por esta razón, el otro objetivo de este estudio ha sido determinar la diversidad microbiana de este hábitat, cuantificando y caracterizando las distintas comunidades microbianas autóctonas, así como sus capacidades metabólicas.

La empresa balnearia, a través de un laboratorio especializado, realiza análisis periódicos para controlar la calidad sanitaria de las aguas, pero es la primera vez que se estudia su microbiota autóctona y las actividades metabólicas que intervienen en los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza.



FIGURA 2. *Manantial Termas. Galería de baños y punto de emergencia.*



FIGURA 3. *Manantial Río. Punto de emergencia. Río Rudrón y canalización.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras se tomaron en octubre del año 2007 en los puntos de emergencia de los manantiales Termas y Río. El agua se recogió en recipientes estériles de plástico de 1,5 litros de capacidad, los cuales se trasladaron, a temperatura de refrigeración y en oscuridad, hasta el laboratorio donde se analizaron antes de 24 horas.

Microorganismos totales y vivos

El recuento de microorganismos totales y vivos se ha realizado por la técnica de fluorescencia empleando un microscopio de epifluorescencia (Nikon). Las muestras de agua se tiñeron con el «kit» de viabilidad bacteriana «BacLight Live/Dead» (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), filtrando por un filtro Nucleopore de 0,2 μm . El resultado se ha expresado como número de microorganismos totales y vivos por mililitro de muestra (2).

Bacterias aerobias

El recuento de bacterias viables y esporuladas se ha realizado por las técnicas de filtración y dilución en placa. Se han utilizado los medios agar extracto de levadura (AE) (3) para las heterótrofas viables, y agar R₂A (4) para las oligotrofas viables, y los mismos medios adicionados con 0,1% de almidón (AEA y R₂AA) para las esporuladas, incubando a 22° C, cinco días y a 37° C, 48 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro de agua (ufc/mL).

Microorganismos de interés sanitario

Se han realizado los recuentos de coliformes totales, coliformes fecales, enterococos, esporas de *Clostridium* sulfito-reductores y *C. perfringens* y se ha investigado la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* por los métodos oficiales de las aguas de bebida envasadas (5) y de consumo humano (3). La detección de *Staphylococcus aureus* se ha realizado filtrando 250 mL de agua, inoculando el filtro en caldo triptona soja y aislando en agar Baird-Parker (6), incubando a 37° C, 48 horas. La investigación de *Legionella pneumophila* se ha hecho por la técnica de filtración descrita por Pelaz y Martín (7).

Microorganismos de interés ecológico

El número de bacterias proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas, amonificantes, nitrificantes y sulfato-reductoras, se determinó por la técnica del número más probable (NMP), utilizando los medios descritos por Pochon y Tardieux (8) y el medio de Starkey (9) para las últimas, e incubando a 30° C durante 30 días. Los resultados se han expresado como NMP de microorganismos por 100 mL de agua.

Los recuentos de bacterias halófilas moderadas, actinomicetos y hongos se han realizado por la técnica de filtración, utilizando agar halófilo con 15% de cloruro sódico (10), agar para actinomicetos (Difco) y agar Sabouraud con cloramfenicol al 0,05% (6), 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 mL de agua.

La presencia de algas y cianobacterias se ha determinado filtrando 100 mL e inoculando el filtro en medio Stanier (11), incubando con iluminación controlada a 24° C, durante 30 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 movilidad) (12). Además se utilizó el sistema de identificación por pruebas bioquímicas miniaturizadas API[®] (bioMérieux), empleando las galerías 20 E y 20 NE para los bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores, respectivamente. Para su clasificación se siguieron los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (13, 14, 15).

Los hongos filamentosos se han identificado por la morfología de las colonias y la observación microscópica de las hifas, esporangios y esporas, siguiendo los criterios de Pitt y Hocking (16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microorganismos totales y vivos

El número de microorganismos totales ha sido de 13×10^4 /mL en el manantial Termas, y $2,9 \times 10^4$ en el manantial Río, estando la mayoría vivos, 80,7% y 82,6%, respectivamente. Estos resultados son inferiores a los encontrados en otros manantiales de aguas mineromedicinales hipotermales (17, 18).

Bacterias aerobias

En el punto de emergencia de los manantiales, el número de bacterias heterotróficas y oligotrofas aerobias viables, detectadas en los medios AE y R₂A, respectivamente, ha sido inferior a 100 ufc/mL, y el de bacterias esporuladas inferior a 5 ufc/mL, lo que indica que, actualmente, la protección de los manantiales es adecuada (Tabla 1). El manantial Río tiene más bacterias aerobias viables que el Termas. Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles bicarbonatados (18, 19, 20). Ambos manantiales presentan más bacterias oligotrofas que heterótrofas, lo que es propio de las aguas subterráneas donde predominan estas bacterias oligotrofas que viven a concentraciones muy bajas de sustratos orgánicos (21).

TABLA 1. Número de bacterias aerobias viables y esporuladas (ufc/mL)

<i>Bacterias aerobias</i>		<i>T^a</i>	<i>Manantiales</i>	
			<i>Termas</i>	<i>Río</i>
Viables	heterótrofas	22° C	<1	45
		37° C	<1	8
	oligotrofas	22° C	4	94
		37° C	1	25
Esporuladas	heterótrofas	22° C	<1	1
		37° C	<1	1
	oligotrofas	22° C	1	3
		37° C	1	5

La diferencia entre los recuentos de microorganismos totales y viables ha sido de hasta tres unidades logarítmicas, lo que se debe a la dificultad de muchos microorganismos acuáticos de desarrollarse en las condiciones de cultivo de laboratorio. Además varios autores señalan que sólo una pequeña proporción de los microorganismos de los ambientes acuáticos son detectados, ya que no presentan actividad metabólica y se encuentran en el estado de viable no cultivable (22, 23).

Se han aislado 114 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, de las cuales han sido identificadas un 83,3%, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos fermentadores (45,6%) y no fermentadores (31,6%), bacilos y cocos Gram positivos (22,8%). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (14), las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al *Phylum Proteobacteria* (71,6%), clases *Alfa* (4,2%), *Beta* (7,4%) y *Gamma* (60,0%), y en menor proporción a los *Phyla: Actinobacteria* (16,8%), *Firmicutes* (10,5%) y *Bacteroidetes* (1,1%) (Figura 4). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en aguas subterráneas (22), aguas minerales envasadas (24) y manantiales minerales fríos (25) y termales (20).

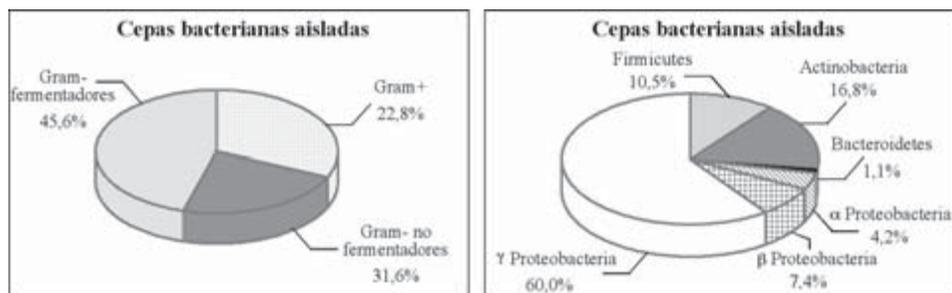


FIGURA 4. *Diversidad de bacterias viables (% de cepas).*

Estas aguas presentan una gran diversidad bacteriana, ya que se han identificado 17 especies distintas en el manantial Termas, y 20 en el manantial Río. En el primero han predominado las bacterias Gram negativas no fermentadoras, *Betaproteobacteria* y de ellas la especie *Burkholderia cepacia* (5,3%), mientras que en el segundo son más frecuentes las bacterias Gram negativas fermentadoras, *Gam-*

maproteobacteria, principalmente la especie *Aeromonas hydrophila* (15,8%) (Tabla 2). *Burkholderia cepacia* es una bacteria ubicua, aislada frecuentemente en agua debido a sus escasos requerimientos nutricionales y ha sido encontrada en manantiales mineromedicinales (18-20) y en aguas minerales envasadas (24, 26). *Aeromonas hydrophila* es una bacteria autóctona del agua y también ha sido detectada por diversos autores en aguas minerales (18, 19, 27).

Otras especies encontradas como: *Ochrobactrum anthropi* (*Alpha-proteobacteria*), *Pseudomonas fluorescens* y *P. alcaligenes* (*Gammaproteobacteria*) están ampliamente distribuidas en la naturaleza, suelo y agua (15) y se han aislado en otros manantiales minerales bicarbonatados (18-20) y en aguas envasadas (28).

En relación a las cepas de bacterias Gram negativas fermentadoras se han detectado diversos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos pertenecen al grupo coliforme y se encuentran habitualmente en el suelo, plantas y aguas, como *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. En aguas subterráneas estos coliformes proceden generalmente del suelo y se han aislado en muestras de agua de distintas procedencias (18, 19, 29), en ausencia de indicadores fecales. Otras especies aisladas, como *Budvicia aquatica*, *Rahnella aquatilis* y *Serratia fonticola*, son bacterias autóctonas del agua que han sido encontradas en diversas regiones del mundo (15, 29-31).

Algunas de las especies detectadas pueden ser patógenas oportunistas (15), sin embargo, no se ha descrito ninguna relación entre la exposición y el consumo de aguas minerales y la presencia de estas bacterias en las mismas, por lo que no existe riesgo para la salud de los usuarios que utilizan este agua en sus distintas formas de administración (32).

En estos manantiales se han detectado, en pequeña proporción, bacilos Gram positivos de los géneros *Bacillus* y *Corynebacterium* (Tabla 2). Estas bacterias, que proceden del suelo, se han encontrado en aguas envasadas (33) y en otros manantiales minerales hipotermas (17, 18), pero son más abundantes en manantiales hipertermales (34, 35).

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Estas bac-

TABLA 2. Géneros y especies de bacterias heterótrofas y oligotrofas (% cepas)

Bacterias	Manantial Termas n = 50	Manantial Río n = 64	Total n = 114
BACILOS GRAM-			
No fermentadores	21,1	10,5	31,6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,8	–	1,8
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0,9	–	0,9
<i>Burkholderia cepacia</i>	5,3	–	5,3
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	–	0,9	0,9
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2,6	–	2,6
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2,6	–	2,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,9	4,4	5,3
<i>Pseudomonas</i> spp	0,9	0,9	1,8
<i>Ralstonia pickettii</i>	0,9	–	0,9
<i>Stenotrophomonas malthophilia</i>	–	0,9	0,9
No identificados	5,3	3,5	8,8
Fermentadores	14,4	34,2	45,6
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,6	15,8	18,4
<i>Aeromonas</i> spp	–	0,9	0,9
<i>Budvicia aquatica</i>	0,9	1,8	2,6
<i>Citrobacter freundii</i>	–	3,5	3,5
<i>Citrobacter koseri</i>	–	0,9	0,9
<i>Citrobacter</i> spp	–	0,9	0,9
<i>Enterobacter amnigenus</i>	–	0,9	0,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,9	–	0,9
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,9	–	0,9
<i>Enterobacter</i> spp	0,9	0,9	1,8
<i>Hafnia alvei</i>	–	0,9	0,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	1,8	1,8
<i>Pantoea</i> spp	0,9	–	0,9
<i>Rahnella aquatilis</i>	–	0,9	0,9
<i>Raoultella terrigena</i>	–	0,9	0,9
<i>Serratia fonticola</i>	–	0,9	0,9
No identificados	4,4	3,5	7,9
BACTERIAS GRAM+	11,4	11,4	22,8
<i>Bacillus</i> spp	1,8	4,4	6,1
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	6,1	4,4	10,5
<i>Micrococcus</i> spp	3,5	–	3,5
<i>Staphylococcus</i> spp	–	2,6	2,6

terias son muy ubicuas y se han detectado en aguas mineromedicinales (18, 20) y envasadas (36).

Microorganismos de interés sanitario

Los manantiales no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium* sulfito-reductores y *Clostridium perfringens*) en 100 mL de agua, ni bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua, por lo que las muestras cumplen con la normativa de aguas de consumo humano (3). En el manantial Río se han encontrado coliformes totales y termotolerantes (18 y 8 ufc/100 mL) pertenecientes a las especies *Citrobacter freundii* y *Enterobacter amnigenus*. La presencia de estas especies en las aguas, en ausencia de *E. coli*, no indican contaminación fecal, ya que son muy ubicuas y no suponen riesgo para la salud de los usuarios (37).

Microorganismos de interés ecológico

La investigación de los microorganismos de interés ecológico en los ecosistemas acuáticos es importante para conocer el flujo de energía y materia orgánica e inorgánica y su relación con las características físico-químicas de los mismos. En las aguas minerales naturales se encuentran comunidades microbianas autóctonas que participan en los ciclos biogeoquímicos, principalmente del carbono y del nitrógeno, transformando los compuestos para proveer de nutrientes a otros organismos de la comunidad, además estas actividades metabólicas favorecen la autodepuración de posibles contaminantes (21, 38).

Los dos manantiales estudiados presentan microorganismos amonificantes y amilolíticos y en el manantial Río también se han detectado proteolíticos, celulolíticos, nitrificantes, hongos, cianobacterias y algas. No se han encontrado bacterias sulfato-reductoras, halófilas ni actinomicetos (Tabla 3).

TABLA 3. Número de microorganismos de interés ecológico

<i>Microorganismos</i>	<i>Manantial Termas</i>	<i>Manantial Río</i>
NMP/100 mL		
Proteolíticos	<3	930
Amonificantes	430	1.400
Amilolíticos	36	150
Celulolíticos	<3	36
Sulfato-reductores	<3	<3
Nitrificantes	<3	36
UFC/100 mL		
Actinomicetos	–	–
Halófilos	–	–
Hongos	5	160

Las bacterias aisladas que intervienen en el ciclo del carbono con actividad proteolítica son *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens*, con actividad amilolítica, *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus spp* y con actividad celulolítica, *Cellvibrio*. Tanto las bacterias proteolíticas como las amilolíticas están ampliamente distribuidas en los hábitats acuáticos y se han encontrado en diversos manantiales mineromedicinales (18-20). Actualmente, son objeto de estudio los enzimas que producen estas bacterias, aisladas de manantiales termales en diversas partes del mundo, por sus posibles aplicaciones en Biotecnología (39).

Las bacterias amonificantes identificadas en estas aguas son *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas hydrophila*. Estas bacterias intervienen en el ciclo del nitrógeno en los hábitats acuáticos, degradando los compuestos orgánicos nitrogenados (38) y han sido aisladas en otros manantiales mineromedicinales (18-20).

Los hongos filamentosos se han detectado, principalmente, en el manantial Río y pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*. El estudio de la microbiota en aguas minerales es poco frecuente debido a su bajo número, sin embargo algunos de estos géneros se han encontrado en otros manantiales mineromedicinales (18-20). En los últimos años existe un gran interés por conocer la ecología de los hongos en aguas minerales envasadas (40, 41) y

de consumo humano (42), tanto por las implicaciones sanitarias como por las alteraciones organolépticas que pueden ocasionar en las aguas de bebida.

En el manantial Río también se han detectado algas filamentosas (*Ulothrix*), diatomeas (*Fragilaria*) y cianobacterias, tanto filamentosas (*Pseudanabaena*) como esféricas (*Synechocystis*) (Figuras 5 y 6). Estos microorganismos fotosintéticos no se desarrollan en aguas subterráneas, pero cuando estas aguas emergen a la superficie, las condiciones ambientales, principalmente la intensidad de luz y la temperatura, favorecen su crecimiento llegando a formar biotapetes (43), siendo frecuentes en manantiales fríos (18) y calientes (19, 44).



FIGURA 5. *Fragilaria* y *Ulothrix*. Observación por microscopía de contraste de fases y luz ultravioleta (40x).

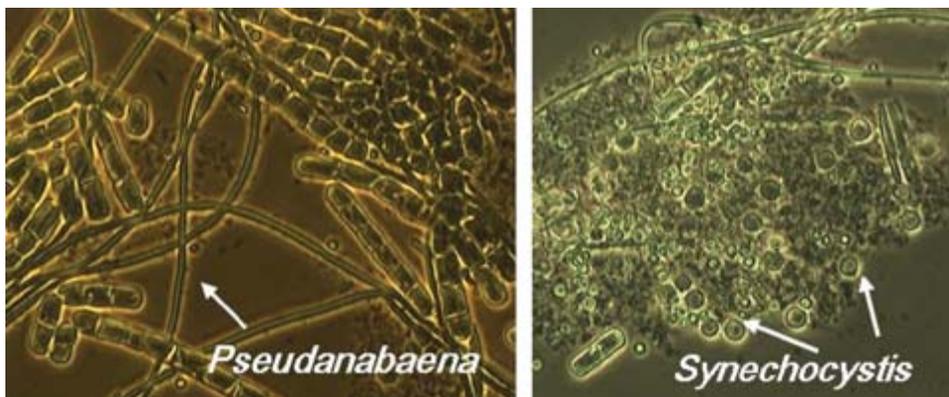


FIGURA 6. *Pseudanabaena* y *Synechocystis*. Observación por microscopía de contraste de fases (40x).

CONCLUSIONES

Los manantiales presentan un número bajo de bacterias viables y esporuladas, lo que indica que, actualmente, la protección de los manantiales es adecuada. Desde el punto de vista sanitario, no contienen indicadores fecales ni microorganismos patógenos, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacilos Gram negativos, de la clase *Gammaproteobacteria*. Se han detectado bacterias con actividad proteolítica, amilolítica, amonificante, celulolítica y nitrificante que intervienen en los ciclos biogeoquímicos y contribuyen en la autodepuración de las aguas.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la empresa Castelar, propietaria del Balneario, a su representante don José Mirones Díaz y a la directora, doña María Cáceres todas las atenciones que han tenido con ellas durante su estancia en el establecimiento, así como las facilidades dadas para la toma de las muestras.

También quieren expresar su agradecimiento, muy especialmente, a doña María Teresa Grande Herranz, gerente de ANBAL (Asociación Nacional Balnearia) por todas las gestiones realizadas, a lo largo de muchos años, con los balnearios y sin cuyo interés, empeño y dedicación, no hubiera sido posible realizar estos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANÓNIMO (1887): *Gaceta de Madrid*, 27 de abril de 1887, 117: 245.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.

- (5) 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.
- (6) ANÓNIMO (1998): *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition. American Public Health Association. Washington.
- (7) PELAZ, C. y MARTÍN, C. (1993): *Legionellosis*. Datos de España, diagnóstico de laboratorio y control en instalaciones de edificios. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
- (8) POCHON, J. et TARDIEUX, P. (1956): *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. De la Tourelle. St. Mandé (Seine).
- (9) RODINA, A. G. (1972): *Methods in aquatic microbiology*. University Park Press. Baltimore.
- (10) ANÓNIMO (2001): *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 14th edition. American Public Health Association. Washington.
- (11) STANIER, R.; ADELBERG, E. and INGRAHAM, J. (1984): *Microbiología*. Reverté. Barcelona.
- (12) BARROW, G. I. and FELTHAM, R. K. A. (1993): *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge.
- (13) HOLT, J. G.; KRIEG, N.; SNEATH, D.; STALEY, J. and WILLIAMS, S. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (14) GARRITY, G.; BRENNER, D.; KRIEG, N. and STALEY, J. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. I. Springer. New York.
- (15) GARRITY, G.; BRENNER, D.; KRIEG, N. and STALEY, J. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. II. *The Proteobacteria*. Part B and C. Springer. New York.
- (16) PITT, J. L. and HOCKING, A. D. (1997): *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional. London.
- (17) 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. R. Acad. Farm.* 67: 173-183.
- (18) MOSSO, M. A.; SÁNCHEZ, M. C.; RODRÍGUEZ, C. y DE LA ROSA, M. C. (2006): «Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes». *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 72: 285-304.
- (19) DE LA ROSA, M. C.; ANDUEZA, F.; SÁNCHEZ, M. C.; RODRÍGUEZ, C. y MOSSO, M. A. (2004): «Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba». *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 70: 521-542.
- (20) DE LA ROSA, M. C.; SÁNCHEZ, M. C.; RODRÍGUEZ, C. y MOSSO, M. A. (2007): «Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario de Puente Viesgo». *Anal. R. Acad. Farm.* 73: 251-265.
- (21) LECLERC, H. and MOREAU, A. (2002): «Microbiological safety of natural mineral water». *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 207-222.
- (22) ULTEE, A.; SOUVATZI, N.; MANIADI, K. and KÖNIG, H. (2004): «Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany». *J. Appl. Microbiol.* 96: 560-568.
- (23) OLIVER, J. D. (2005): «The viable nonculturable state in bacteria». *J. Microbiol.* 43: 93-100.

- (24) LOY, A.; BEISER, W. and MEIER, H. (2005): «Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling». *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1532-1543.
- (25) PERREAULT, N. N.; ANDERSEN, D. T.; POLLARD, W. H.; GREER, C. V. and WHYTE, L. G. (2007): «Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic». *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1532-1543.
- (26) 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.
- (27) CROCI, L.; PASQUALE, S.; COZZI, L. and TOTI, L. (2001): «Behavior of *Aeromonas hydrophila* in bottled mineral waters». *J. Food Prot.* 64: 1836-1840.
- (28) ELOMARI, M.; COROLER, L.; IZARD, D. and LECLERC, H. (1995): «A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters». *J. Appl. Bacteriol.* 78: 71-81.
- (29) KÄMPFER, P.; NIENHÜSER, A.; PACKROFF, G.; WERNICKE, F.; MEHLING, A.; NIXDORF, K.; FIEDLER, S.; KOLAUCH, C. and ESSER, M. (2007): «Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system». *Int. J. Hyg. Environ. Health.* Sep. 14.
- (30) POKHYL, S. I. (1998): «The biological properties of *Rahnella aquatilis* strains isolated in different regions». *Mikrobiol. Z.* 60: 31-37.
- (31) SCHUBERT, R. H. and GROEGER-SÖHN, S. (1998): «Detection of *Budvicia aquatica* and *Pragia fontium* and occurrence in surface waters». *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 201: 371-376.
- (32) PAVLOV, D.; DE WET, C.; GRABOW, W. and EHLERS, M. (2004): «Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water». *Int. J. Food Microbiol.* 92: 275-287.
- (33) JAENA, M.; DEEPA, P.; MUJEEB, K.; SHANTI, R. and HATHA, A. (2006): «Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets». *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 209: 191-196.
- (34) HAZEN, A. and MANAR, A. (2003): «Genetic polymorphism by RAPD-PCR and phenotypic characteristics of isolated thermotolerant *Bacillus* strains from hot spring sources». *New Microbiol.* 26: 249-256.
- (35) BEL'KOVA, N. L.; PARFENOVA, V. V.; SUSLOVA, T. S.; AN, T. S. and TADZAKI, K. (2005): «Biodiversity and activity of the microbial community in the Kotelnikovskiy hot spring (Lake Baikal)». *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 6: 664-671.
- (36) TSAI, G. J. and YU, S. C. (1997): «Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan». *Int. J. Food Microbiol.* 37: 137-143.
- (37) PAYMENT, P.; WAITE, M. and DUFOUR, A. (2003): «Introducing parameters for the assessment of drinking water quality». En: *Assessing Microbial Safety of Drinking Water.* Cap. 2, pp. 44-77. WHO and OECD. Ginebra.
- (38) CHAPELLE, F. (2000): *Ground-water microbiology and geochemistry.* John Wiley and Sons. New York.
- (39) ANTRANIKIAN, G.; VORGAS, C. E. and BERTOLDO, C. (2005): «Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts». *Ads. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96: 219-262.

- (40) CABRAL, D. and FERNÁNDEZ, P. (2002): «Fungal spoilage of bottled mineral water». *J. Food Microbiol.* 30: 73-76.
- (41) RIBEIRO, A.; MACHADO, A. P.; KOZAKIEWICZ, Z.; RYAN, M.; LUKE, B.; BUDDIE, A. J.; VENANCIO, A.; LIMA, N. and KELLY, J. (2006): «Fungi in bottled water: a case study of a production plant». *Rev. Iberoam. Micol.* 23: 139-144.
- (42) HAGESKAL, G.; KNUTSEN, A. K.; GAUSTAD, P.; DE HOOG, G. S. and SKAAR, I. (2006): «Diversity and significance of molds species in Norwegian drinking water». *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7586-7593.
- (43) ALLEWALT, J. P.; BATESON, M.; REVSBECH, N.; SLACK, N. and WARD, D. (2006): «Effect of temperature and light on growth and photosynthesis by *Synechococcus* isolates typical of those predominanting in the Octopus spring microbial mat community of Yellowstone National Park». *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 544-550.
- (44) HONGMEI, J.; AITCHISON, J.; LACAP, D.; PEERAPORNPIHAL, Y.; SOMPONG, U. and POINTING, S. (2005): «Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China, the Philippines and Thailand». *Extremophiles.* 9: 325-332.