

CAPÍTULO IV

Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres

M.^a Carmen de la Rosa Jorge, Concepción Pintado García, Carmina Rodríguez Fernández, M.^a Ángeles Mosso Romeo

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

RESUMEN

Se han estudiado los manantiales mineromedicinales, Baños y Baños de Abajo del Balneario de Alicún de las Torres (Granada). El número total de microorganismos en el agua ha sido de 7.6×10^4 /mL, respectivamente, estando la mayoría vivos (79 y 85,5%). El número de bacterias heterótrofas y oligotrofas viables a 22 °C y 37 °C ha sido inferior a 100 ufc/mL, y corresponden, en su mayoría, a bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la clase *Gammaproteobacteria* (54,5%) y, en menor proporción, a bacilos (29,1%) y cocos Gram positivos (16,4%). Las principales especies han sido: *Aeromonas hydrophila*, en el manantial Baños de Abajo y *Pseudomonas putida*, en el manantial Baños. No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos. Se han detectado microorganismos amonificantes, proteolíticos, amilolíticos, halófilos y hongos en 100 mL de agua. También se estudiaron los biotapetes formados en los manantiales Baños de Abajo y Eucaliptos, constituidos por una asociación de cianobacterias filamentosas (*Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Lyngbya*) y esféricas (*Cyanothece*, *Synechocystis*), diatomeas (*Cymbella*, *Fragilaria*, *Navicula*, *Nitzschia*) y algas verdes (*Cosmarium*).

Palabras clave: Manantiales termales; Balneario de Alicún de las Torres; Microbiota autóctona; Biodiversidad; Biotapetes.

ABSTRACT

Microbiology of the mineral springs of Alicún de las Torres spa.

Two mineral springs, called Baños and Baños de Abajo, have been studied in the Spa Alicún de las Torres (Granada). The total number of microorganisms present in the water was of 7.6 and 4×10^4 /mL, respectively, being the majority alive (79 and 85.5%). The number of viable heterotrophic and oligotrophic bacteria, at 22 °C and 37 °C, was lower than 100 cfu/mL. The strains of the heterotrophic bacteria isolated predominantly correspond to fermenters and non-fermenters Gram-negative bacilli, belonging to the Class *Gammaproteobacteria* (54.5%) and in smaller proportion to Gram-positive bacilli (29.1%) and cocci (16.4%). The most common identified species were: *Aeromonas hydrophila* in the Baños de Abajo spring, and *Pseudomonas putida* in the Baños spring. Neither faecal indicators nor pathogenic microorganisms were found. On the other hand, ammonifying, proteolytic, amylolytic, halophilic bacteria as well as fungi were detected in 100 mL of water. The microbial mats of Baños de Abajo and Eucaliptos springs were studied as well. Both mats consist of an association of filamentous cyanobacteria (*Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Lyngbya*), sphaeric cyanobacteria (*Cyanothece*, *Synechocystis*), diatoms (*Cymbella*, *Fragilaria*, *Navicula*, *Nitzschia*) and green algae (*Cosmarium*).

Key Words: Thermal springs; Alicún de las Torres spa; Autochthona microbiota; Biodiversity; Microbial mats.

1. INTRODUCCIÓN

El Balneario de Alicún de las Torres pertenece al término municipal de Villanueva de las Torres, en la provincia de Granada. Se encuentra situado en la Hoya de Guadix, en la confluencia de los ríos Fardes y Gor, rodeado de abundante vegetación (Figura 1).



Figura 1. Edificios del Balneario.

En la zona emergen varios manantiales de aguas termales que pudieron ser utilizados desde tiempos prehistóricos ya que, en las inmediaciones, hay restos de numerosos dólmenes, algunos menhires y una formación travertínica, en forma de muralla, denominada «El Toril», originada por el depósito de las aguas termales y utilizada como acequia desde tiempos inmemoriales. Posteriormente, las aguas mineromedicinales fueron empleadas en forma de baños por romanos, musulmanes y cristianos. En el siglo XVIII eran muy conocidas, como constata el médico Juan de Dios Ayuda en 1793, que describe su situación *«Cuatro leguas largas á el Norte de ésta Ciudad de Guadix hay otra fuente medicinal llamada Baños de Alicún; tal vez por unas torres (...) Nace en un derrumbadero á corta distancia de la margen meridional del río Fardes, y por el lado que mira al Norte, de una roca (...) Tal es la abundancia de manantiales, que casi se puede tener por uno toda la raíz de la dilatada risca...»*, sus características físicas, el análisis químico y las virtudes y efectos de las mismas (1). Estas aguas, declaradas de utilidad pública en 1870 (2), han seguido utilizándose para tratamientos terapéuticos hasta la actualidad.

Este trabajo ha tenido dos objetivos, primero determinar los microorganismos que pudieran suponer un riesgo sanitario para los

usuarios del Balneario, tanto los indicadores de contaminación fecal como los patógenos, ya que el agua se utiliza en tratamientos terapéuticos. En segundo lugar, se ha estudiado por primera vez la microbiota autóctona, propia de estos manantiales que depende de las características físicas y químicas de los mismos, así como sus actividades metabólicas que tienen un importante papel en la auto-depuración de las aguas. También se han estudiado los biotapetes que se forman en estos manantiales, frecuentes en los ambiente acuáticos y que están constituidos por comunidades microbianas complejas.

2. RESULTADOS

2.1. Manantiales

El Balneario, en la actualidad, utiliza tres manantiales minero-medicinales denominados Baños, Baños de Abajo y Eucaliptos. El punto de emergencia del manantial Baños se encuentra en el interior del edificio del Balneario (Figura 2a) y sus aguas se emplean para los tratamientos terapéuticos. El manantial Baños de Abajo emerge directamente del suelo, al aire libre, en el Cerro de la Mina y a través de una canalización llega al Balneario donde se utiliza para los usos sanitarios (Figura 2b). El manantial Eucaliptos surge en una zona aneja al Balneario, protegido por una caseta, donde se clora y se canaliza el agua hasta una fuente y de allí hasta la piscina al aire libre situada un centenar de metros más abajo. Estas aguas minero-medicinales emergen a una temperatura de 34 °C, son neutras (pH 7,2), y se clasifican como de mineralización fuerte, sulfatadas, cálcicas y magnésicas (3).

Para realizar este estudio se han tomado, en junio de 2008, muestras de agua en los puntos de emergencia de los manantiales Baños y Baños de Abajo, que se utilizan en el Balneario, en recipientes estériles de 1,5 litros, por duplicado y se trasladaron, a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta el laboratorio donde se analizaron antes de las 24 horas. Además se han recogido, en recipientes estériles, los biotapetes formados en los manantiales Baños de Abajo y Eucaliptos.



Figura 2. Puntos de emergencia. a) Manantial Baños. **b)** Manantial Baños de Abajo.

2.2. Microorganismos totales y vivos

La microbiota autóctona de los ambientes acuáticos es muy variada tanto en los tipos como en el tamaño y en los estados fisiológicos en que se encuentran. La técnica más adecuada para conocer el número y la morfología de todos los microorganismos presentes en estos hábitats es el recuento directo con microscopio de fluorescencia. Además, utilizando los fluorocromos adecuados, podemos determinar también el número de microorganismos vivos.

En este estudio se han utilizado los colorantes syto 9 y yoduro de propidio del «kit» «BacLight Live/Dead» (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Las muestras teñidas se filtraron por 0,2 mm y se observaron con objetivo de inmersión en un microscopio de epifluorescencia (Nikon). Se contaron el número de células verdes (vivas) y rojas (muertas), expresando el resultado como número de microorganismos totales y vivos por mililitro de agua (4).

El número de microorganismos totales ha sido de $7,6 \times 10^4$ /mL en el manantial Baños y 4×10^4 /mL en el manantial Baños de Abajo, estando la mayoría vivos, 79% y 85,5%, respectivamente. Estos resultados son semejantes a los encontrados en otros manantiales de aguas mineromedicinales sulfatadas, mesotermales (5). Los recuentos obtenidos por esta técnica suelen ser de 10^2 a 10^3 mayores que los obtenidos por cultivo debido a que se contabilizan todos los microorganismos presentes, incluso los muertos.

2.3. Bacterias aerobias viables

El número de las bacterias heterótrofas se ha utilizado, desde finales del siglo XIX, como indicador de la calidad del agua de bebida y de las aguas subterráneas. Cifras inferiores a 100 ufc/mL indican una buena protección del acuífero y no representan un riesgo sanitario (6, 7).

El recuento de bacterias aerobias viables se ha realizado por las técnicas de filtración (filtros de 0,22 mm) y dilución en placa. Se han utilizado los medios agar extracto de levadura (8) para las heterótrofas y agar R₂A (9) para las oligotrofas, 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).

En el punto de emergencia de los manantiales, el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables ha sido inferior a 100 ufc/mL, lo que significa que la protección de los manantiales es adecuada (Tabla 1). Ambos manantiales presentan más bacterias oligotrofas que heterótrofas, propio de las aguas subterráneas donde predominan las bacterias que viven a concentraciones muy bajas de compuestos orgánicos (6). Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles sulfatados (10).

La diferencia entre los recuentos de microorganismos vivos, obtenidos por microscopía de fluorescencia, y de bacterias viables, determinadas por cultivo, significa que más del 99% de las células microbianas no pueden cultivarse ya que son incapaces de crecer en las condiciones y medios de cultivo utilizados en el laboratorio y, además, muchas se encuentran en el estado de viable no cultivable (11).

Tabla 1. Número de bacterias aerobias viables (ufc/mL).

<i>Bacterias aerobias</i>	<i>T^a</i>	<i>Manantiales</i>	
		<i>Baños</i>	<i>Baños de Abajo</i>
Heterótrofas	22 °C	37	12
	37 °C	30	14
Oligotrofas	22 °C	50	22
	37 °C	34	7

2.4. Microorganismos de interés sanitario

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

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 (12) y de consumo humano (8). La detección de *Staphylococcus aureus* se ha realizado filtrando 250 mL de agua, cultivando el filtro en caldo triptona soja, aislando en agar Baird-Parker (13) e incubando a 37 °C, 48 horas. La investigación de *Legionella pneumophila* se ha hecho por la técnica de filtración, aislando en agar BCYE alfa (Difco) (14).

Los manantiales Baños y Baños de Abajo 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 y aguas de bebida envasadas (8, 15).

2.5. Microorganismos de interés ecológico

Las aguas minerales naturales presentan una microbiota autóctona de gran interés ecológico. La presencia de bacterias heterótrofas es esencial en los procesos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre que ocurren en los sistemas hidrotermales. Estos microorganismos poseen diversas capacidades metabólicas, transformando los compuestos orgánicos en inorgánicos y manteniendo el equilibrio biológico del hábitat (6, 16).

En este trabajo se ha determinado el número de bacterias que intervienen en el ciclo del carbono (proteolíticas, amilolíticas, celulólicas), del nitrógeno (amonificantes, nitrificantes) y del azufre

(oxidantes del tiosulfato, sulfato-reductoras). Se ha utilizado la técnica del número más probable (NMP) y los medios descritos por Pochon y Tardieux (17) para las bacterias del ciclo del carbono y del nitrógeno, el medio de Stanier para las que oxidan el tiosulfato (18) y el de Starkey (19) para las sulfato-reductoras. La incubación se ha realizado a 30 °C durante 30 días y los resultados se han expresado como NMP de microorganismos por 100 mL de agua (Tabla 2).

Tabla 2. Número de microorganismos de interés ecológico.

Microorganismos	Baños	Baños de Abajo
NMP/100 mL		
Proteolíticos	1,1.10 ³	4,6.10 ²
Amilolíticos	4,6.10 ²	2,4.10 ²
Celulolíticos	<3	<3
Amonificantes	1,1.10 ⁴	2,1.10 ³
Nitrificantes	<3	<3
Sulfato-reductores	<3	<3
UFC/100 mL		
Actinomicetos	–	–
Halófilos	13	10
Hongos	2	600

Los dos manantiales presentan bacterias proteolíticas, amilolíticas y amonificantes y no se han detectado celulolíticas, ni nitrificantes. Los microorganismos con enzimas proteolíticos y amilolíticos juegan un papel importante en la autodepuración de las aguas naturales y son frecuentes en ellas, habiéndose encontrado en numerosos manantiales mineromedicinales (5, 10, 20-22). Las bacterias amonificantes degradan los compuestos orgánicos nitrogenados y también son numerosas en aguas minerales (5, 10, 21, 22).

No se han encontrado bacterias del ciclo del azufre, oxidantes del tiosulfato ni sulfato-reductoras. Estas aguas poseen una elevada concentración de sulfatos pero las bacterias sulfato-reductoras son anaerobias estrictas y no suelen encontrarse en la columna de agua sino en los sedimentos, por lo que tampoco se han detectado en otros manantiales sulfatados (23, 24).

Además se han investigado las bacterias que oxidan el hierro utilizando el método de filtración, el medio Duchon Miller (10) e incubando a 30 °C, 30 días. No se han detectado en 100 mL de agua.

También se han estudiado los microorganismos capaces de crecer a concentraciones elevadas de sal, debido a que estas aguas son de mineralización fuerte. Los recuentos se han realizado por la técnica de filtración, utilizando agar halófilo con 15% de cloruro sódico (25), incubando a 30 °C, durante 7 días. Los resultados se han expresado como ufc por 100 mL de agua (Tabla 2). Los dos manantiales presentan un número pequeño de bacterias halófilas facultativas que se han identificado como *Staphylococcus*. Su presencia es normal en este tipo de ambientes salinos y se han detectado en otros manantiales de mineralización semejante (10, 24).

Con el fin de conocer todos los tipos de microorganismos constituyentes de la microbiota autóctona de estos manantiales se han estudiado los actinomicetos, hongos, cianobacterias y algas. El recuento de actinomicetos y hongos se realizó por el método de filtración, utilizando los medios agar para actinomicetos (Difco) y agar Sabouraud con cloranfenicol al 0.05% (13), respectivamente. La presencia de algas y cianobacterias se ha determinado filtrando 100 mL e inoculando el filtro en medio Stanier (18), incubando con iluminación controlada a 24 °C, durante 30 días. No se han detectado actinomicetos, cianobacterias ni algas en ninguna muestra de agua.

Los hongos filamentosos se han encontrado, principalmente, en el manantial Baños de Abajo (Tabla 2) y pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* que proceden del suelo. La identificación se ha basado en la morfología de las colonias y la observación microscópica de las hifas, esporangios y esporas, siguiendo los criterios de Pitt y Hocking (26). La presencia de mohos en aguas minerales es poco frecuente pero también se han encontrado en otros manantiales mineromedicinales (5, 10, 21, 22).

2.6. Identificación de bacterias heterótrofas

Las cepas aisladas en los distintos medios de recuento 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) (27). 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, las galerías Coryne para los bacilos Gram positivos no esporulados y las galerías Staph para los cocos Gram positivos. La clasificación se realizó según los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (28, 29).

En los dos manantiales se han aislado 60 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, de las cuales han sido identificadas 55, un 91,6%, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (54,5%), bacilos Gram positivos (29,1%) y cocos Gram positivos (16,4%). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (29) las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al *Phylum Proteobacteria*, clase *Gamma* (54,5%), y en menor proporción a los *Phyla: Actinobacteria* (34,5%), y *Firmicutes* (10,9%) (Figura 3). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en aguas minerales envasadas (30) y manantiales minerales fríos (22, 31) y termales (5, 21), en los que son mayoritarios los bacilos Gram negativos de la clase *Gammaproteobacteria*.

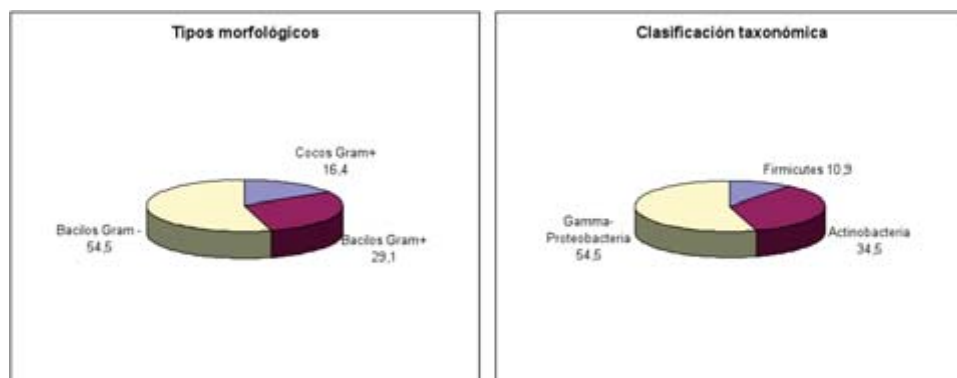


Figura 3. Diversidad de bacterias viables (% de cepas).

En el manantial Baños han predominado las bacterias Gram negativas no fermentadoras, de la especie *Pseudomonas putida* (20%)

mientras que en el manantial Baños de Abajo son más frecuentes las bacterias Gram negativas fermentadoras, principalmente la especie *Aeromonas hydrophila* (44%) (Tabla 3). Las especies del género *Pseudomonas*, debido a sus escasos requerimientos nutricionales que les permite sobrevivir y multiplicarse en ambientes oligotróficos, han sido encontradas en manantiales mineromedicinales (5, 21) y en aguas minerales envasadas (30, 32, 33) en distintos países. *Aeromonas hydrophila* es una bacteria autóctona del agua y también ha sido detectada por diversos autores en manantiales minerales (5, 10, 22) y aguas envasadas (34, 35).

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

Bacterias	Manantial Baños n = 30	Manantial B. de Abajo n = 25
BACILOS GRAM -	43,3	68
No fermentadores	30	24
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	–	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	–	12
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	6,7	–
<i>Pseudomonas putida</i>	20	8
<i>Stenotrophomonas malthophilia</i>	3,3	–
Fermentadores	13,3	44
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10	44
<i>Aeromonas sobria</i>	3,3	–
BACTERIAS GRAM +	56,7	32
Bacilos Gram +	40	16
<i>Arthrobacter aurescens</i>	6,7	–
<i>Corynebacterium spp</i>	10	4
<i>Leifsonia aquatica</i>	6,7	–
<i>Rhodococcus spp</i>	10	12
<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	6,7	–
Cocos Gram +	16,7	16
<i>Kocuria kristinae</i>	6,7	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,3	–
<i>Staphylococcus sciuri</i>	–	8
<i>Staphylococcus warneri</i>	6,7	4

Los bacilos Gram positivos se han encontrado en mayor proporción en el manantial Baños. Las cepas aisladas son de morfología

irregular y muchos tienen pigmentos amarillos, naranjas y rosas. *Arthrobacter* y *Corynebacterium* proceden del suelo y se han encontrado en manantiales minerales hipotermales (10) y mesotermales (20). *Leifsonia aquatica* (antes *Corynebacterium aquaticum*) es propia de ambientes acuáticos y se ha detectado en otros manantiales mineromedicinales (22). *Rhodococcus* es muy resistente a los ambientes extremos ya que posee ácidos micólicos y también se ha aislado de otros manantiales (5, 10, 21). *Rubrobacter radiotolerans* de color rosa, tiene una elevada resistencia a las radiaciones gamma, habiéndose encontrado en manantiales de aguas radiactivas (36-38).

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden a los géneros *Kocuria* y *Staphylococcus*. Estas bacterias son muy ubicuas y pueden vivir en concentraciones más o menos elevadas de sales por lo que se han detectado en aguas mineromedicinales (10, 21, 24, 36, 37) y envasadas (39).

2.7. Biotapetes

La formación de biotapetes superficiales o adheridos a superficies es frecuente en los hábitats acuáticos y han sido estudiados, principalmente, en manantiales termales sulfurosos (20, 40) y alcalinos (41, 42). Están constituidos por comunidades microbianas complejas que dependen de las condiciones ambientales (luz, temperatura, oxígeno) y de la composición del agua (pH, concentración de sales). Estos tapetes están formados por asociaciones de microorganismos procariontes y eucariontes muchos de ellos fotosintéticos y filamentosos (cianobacterias, algas), en donde se alojan otros organismos unicelulares algunos de los cuales producen exopolímeros, lo que facilita su protección de los agentes externos y la disponibilidad de los nutrientes (43). Estas poblaciones comparten sus recursos, aportando diferentes enzimas que metabolizan diversos nutrientes y otras sirven de unión, permitiendo la interacción entre las células. El crecimiento y la actividad de los microorganismos que constituyen los biotapetes pueden modificar, temporalmente, las condiciones ambientales de las superficies que colonizan.

Se han tomado muestras de los tapetes microbianos formados al aire libre en los manantiales Baños de Abajo y Eucaliptos. Las

muestras se tomaron por duplicado con material estéril y se recogieron en envases estériles. Una de ellas se fijó con formol (4%) para conservarla hasta su observación microscópica. La identificación de la microbiota se ha realizado mediante el estudio de su morfología en microscopios de campo claro, campo oscuro, contraste de fases y fluorescencia.

• **Baños de Abajo.** Los biotapetes superficial y epilítico que se desarrollan en este manantial presentan un color verde oscuro brillante, de aspecto gelatinoso y consistencia media. La parte inferior es blanca por la formación de carbonato cálcico. Está compuesto por cianobacterias filamentosas de los géneros *Oscillatoria*, *Pseudanabaena* y *Lymnothrix*. Estas últimas, por su abundancia de vacuolas gaseosas, permiten flotar al biotapete en la superficie del agua. En menor proporción, se encuentran bacterias fototrofas filamentosas del género *Chloroflexus* y cianobacterias esféricas del grupo *Synechocystis*, además se observan distintos tipos de diatomeas (*Navicula*, *Fragilaria*) y bacterias de forma bacilar y espiral (Figura 4).

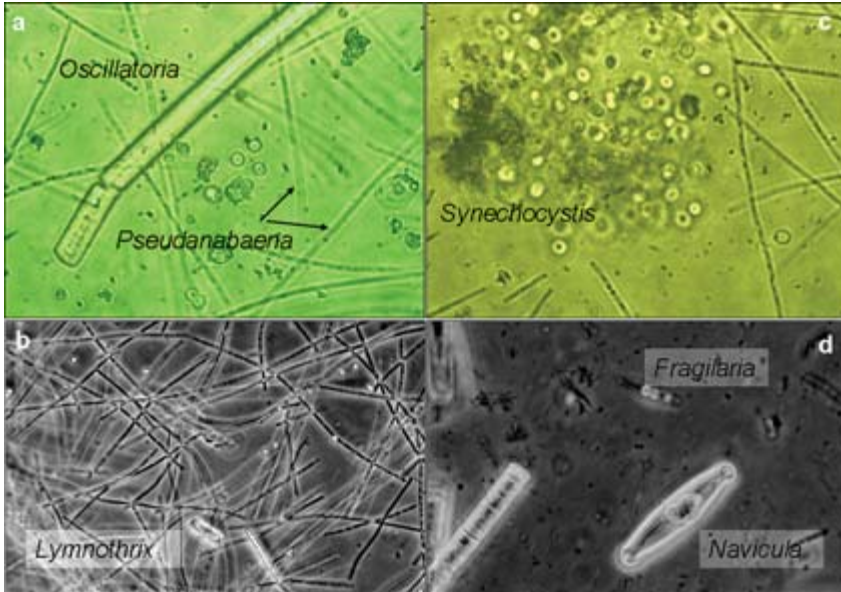


Figura 4. Biotapetes del manantial Baños de Abajo. Microscopía de contraste de fases: (a, c, d) 40x; (b) 20x.

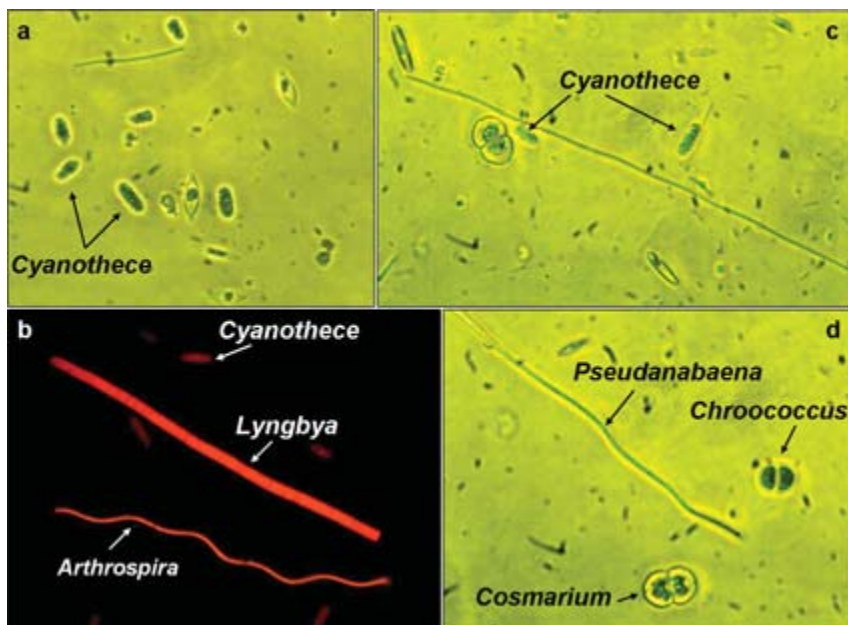


Figura 5. Biotapetes del manantial Eucaliptos. Tapete 1: a) microscopía de contraste de fases 20x; b) microscopía de fluorescencia 40x. **Tapete 3:** c, d) microscopía de contraste de fases 20x.

- **Eucaliptos.** El manantial a lo largo de su recorrido, presenta numerosos biotapetes adheridos a diversas superficies (rocas, suelo, vegetales). En este estudio se han tomado cuatro de ellos que presentaban distinto aspecto macroscópico.

- Tapete 1. Es de color verde claro y muy compacto. Está constituido, principalmente, por cianobacterias filamentosas tabicadas de los géneros *Pseudanabaena*, *Lyngbya*, *Arthrospira* y ovaladas del género *Cyanothece* que presentan autofluorescencia roja con luz ultravioleta, debido a los pigmentos clorofílicos que poseen (Figura 5a, b).

- Tapete 2. Es de color verde oscuro y consistencia gelatinosa. Está formado por cianobacterias filamentosas (*Pseudanabaena*, *Lyngbya*).

- Tapete 3. Presenta grandes burbujas de gas, de color verde brillante. Destaca en este tapete la presencia de abundantes algas

unicelulares del género *Cosmarium* y en menor número *Chroococcus*, además de diatomeas (*Cymbella*, *Nitzschia*) y cianobacterias filamentosas (*Pseudanabaena*) y ovaladas (*Cyanothece*) (Figura 5c, d). La formación de gas se debe al elevado número de algas unicelulares que producen una fotosíntesis oxigénica.

— Tapete 4. Es de color marrón verdoso y consistencia media, presenta también algunas algas del género *Cosmarium*, sin embargo los microorganismos predominantes son las bacterias fototrofas (*Chloroflexus*) y cianobacterias filamentosas (*Pseudanabaena*, *Lyngbya*).

Las comunidades microbianas que constituyen estos tapetes son semejantes a las encontradas en los que forman los manantiales españoles que tienen una composición química semejante (10) y manantiales termales de diferentes partes del mundo (41, 42, 43).

3. CONCLUSIONES

Los manantiales presentan un número bajo de bacterias viables, lo que indica que la protección de los manantiales es adecuada. Desde un 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 y amonificante que intervienen en los ciclos biogeoquímicos y contribuyen a la autodepuración de las aguas.

4. AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a los hermanos Medialdea, propietarios del Balneario y en particular a Don José María, 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.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Ayuda, J. (1793) *Examen de las aguas medicinales de mas nombre, que hay en las Andalucías*. Tomo I. Agustín de Doblas, Impresor de la Universidad. Baeza.
2. Anónimo (1870) *Gaceta de Madrid*, 10 de abril de 1870.
3. Anónimo (2004) *Vademécum de aguas mineromedicinales españolas*. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
4. Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. (1999) Live/Death BacLigh: 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. De la Rosa, M. C., Andueza, F., Sánchez, M. C., Rodríguez, C. & Mosso, M. A. (2004) Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 70: 521-542.
6. Leclerc, H. & Moreau, A. (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 207-222.
7. Bartram, J., Cotruvo, J., Dufour, A., Hazan, S. & Tanner, B. (2004) Heterotrophic plate count. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 239-240.
8. 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.
9. Reasoner, D. J. & Geldreich, E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7.
10. Mosso, M. A., Sánchez, M. C., Rodríguez, C. & de la Rosa, M. C. (2006) Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72: 285-304.
11. Oliver, J. D. (2005) The viable nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93-100.
12. 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.
13. Anónimo (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association. Washington.
14. Pelaz, C. & Martín, C. (1993) Legionelosis. Datos de España, diagnóstico de laboratorio y control en instalaciones de edificios. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
15. Anónimo (2002) Real Decreto 1074/2002, de 18 de octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. *BOE.* 259: 37934-37949.
16. Chapelle, F. (2000) Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley and Sons. New York.
17. Pochon, J. & Tardieux, P. (1956) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle. St. Mandé (Seine).

18. Stanier, R., Adelberg, E. & Ingraham, J. (1984) *Microbiología*. Reverté. Barcelona.
19. Rodina, A. G. (1972) *Methods in aquatic microbiology*. University Park Press. Baltimore.
20. Mosso, M. A., Sánchez, M. C. & de la Rosa, M. C. (2002) Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 68: 381-405.
21. De la Rosa, M. C., Sánchez, M. C., Rodríguez, C. & Mosso, M. A. (2007) Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario de Puente Viego. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73: 251-265.
22. Mosso, M. A., Sánchez, M. C., Pintado, C., Rodríguez, C. & de la Rosa, M. C. (2008) Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 74: 505-521.
23. De la Rosa, M. C., Mosso, M. A., Díaz, F., Vivar, M. C. & Medina, M. R. (1991) Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales de Fitero. Memoria nº 18: 45-60. *Real Acad. Farm.* Madrid.
24. De la Rosa, M. C., Mosso, M. A. & Prieto, M. P. (2001) Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario «El Paraíso» de Manzanera (Teruel). *Anal. Real Acad. Farm.* 67: 173-183.
25. Anónimo (2001) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 14th edition. American Public Health Association. Washington.
26. Pitt, J. L. & Hocking, A. D. (1997) *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional. London.
27. Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993) *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge.
28. Holt, J. G., Krieg, N., Sneath, D., Slaley, J. & Williams, S. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore.
29. Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. II. The *Proteobacteria*. Part B and C. Springer. New York.
30. Loy, A., Beiser, W. & Meier, H. (2005) Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3624-3632.
31. Perreault, N. N., Andersen, D. T., Pollard, W. H., Greer, C. W. & 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.
32. Elomari, M., Coroler, L., Izarz, D. & Leclerc, H. (1995) A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 71-81.
33. Leclerc, H. & Da Costa, M. (2004) *Microbiology of natural mineral waters*. In: *Technology of Bottled water*. 2^a Ed. Blacwell Publishing. Boston.
34. Croci, L., Pasquale, S., Cozzi, L. & Toti, L. (2001) Behavior of *Aeromonas hydrophila* in bottled mineral waters. *J. Food Prot.* 64: 1836-1840.
35. Villari, P., Crispino, M., Montuori, P. & Boccia, S. (2003) Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 69: 697-701.

36. De la Rosa, M. C., Mosso, M. A., Vivar, M. C., Medina, M. R., Arroyo, G. & Díaz, F. (1993) Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario de la Toja. Memoria n° 19: 45-60. *Real Acad. Farm.* Madrid.
37. Mosso, M. A., de la Rosa, M. C. & Vivar, C. (1998) Microbiología del manantial Hervideros del Balneario de Cofrentes. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 64: 53-53.
38. Suzuki, K., Collins, M. D., Ijima, E. & Komagata, K. (1988) Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans*: description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., cpmb. Nov. *FEMS Microbiol. Let.* 52: 33-40.
39. Tsai, G. J. & Yu, S. C. (1997) Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 137-143.
40. Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G. O., Hjorleifsdottir, S. et al. (2000) Influence of sulfite and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2835-2841.
41. Mc Gregor, G. B. & Rasmussen, J. P. (2008) Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: a poliphasic evaluation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 23-35.
42. Boomer, S. M., Noll, K. L., Geesey, G. G. & Dutton, B. E. (2009) Formation of multilayered photosynthetic biofilms in an alkaline thermal spring in Yellowstone National Park, Wyoming. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2464-2475.
43. Lau, M. C., Aitchison, J. C. & Pointing, S. B. (2009) Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles.* 13: 139-149.