

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LA RADIOACTIVIDAD EN AGUAS DEL BALNEARIO DE BAÑOS DE LA CONCEPCIÓN

M. C. Heras Íñiguez*, A. M. Suáñez Fidalgo, C. Gascó Leonarte, B. Romero del Hombrebueno Pozuelo, J. A. Trinidad Ruiz, M. A. Simón Arauzo.

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

RESUMEN

Se ha realizado el estudio radiológico del agua del manantial del Balneario de Baños de la Concepción (Albacete).

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 las aguas del balneario.

La medida del contenido radiactivo de las aguas 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 Baños de la Concepción Spa water.

Radioactivity analysis of Baños de la Concepción Spa water were carried out by the CIEMAT Laboratory of Environmental Radioactivity. With this aim the most important natural radionuclides were determined in water from spring 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.

Keywords: Radioactivity; Radionuclides; Half live; Radioactive series.

1. INTRODUCCIÓN

La Unidad de Radioactividad Ambiental y Vigilancia Radiológica del departamento de Medio Ambiente del CIEMAT ha realizado un estudio de la radiactividad en dos puntos de la surgencia del Balneario de Baños de la Concepción, en el propio manantial y en la fuente que está situada a unos metros de éste. Este trabajo está englobado dentro de un estudio más amplio sobre las características generales de los balnearios españoles en el que se incluyen 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.

2. 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 primigenios, 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 individualmente (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.

3. 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.

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.

4. 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 intrínseco "reverse" (Rege) con su correspondiente cadena electrónica asociada. El detector está rodeado con un blindaje de plomo de 10 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 semidesintegración $T_{1/2} = 1600$ 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 restrictivo desde el punto de vista de protección radiológica, dado que es un emisor alfa con un periodo de semidesintegración muy largo.

Pb-210

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 de $T_{1/2} = 138,4$ 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 (8) mediante un autodepósito 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.

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.

H-3

El tritio es un emisor beta con un periodo de semidesintegración $T_{1/2} = 12,33$ años. Su determinación se puede llevar a cabo mediante destilación y medida directa por centelleo líquido, o bien por concentración electrolítica y medida igualmente por centelleo líquido (9, 10). Por este último método se pueden detectar cantidades menores de actividad.

5. RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la concentración obtenida para los diferentes radionucleidos, de los dos puntos de muestreo, y la media de los dos resultados, expresados como actividad en Bequerelios/Litro y su incertidumbre asociada para un factor de cobertura $k = 2$.

6. CONCLUSIONES

No se ha detectado ningún isótopo radiactivo de origen artificial en las aguas del Balneario de Baños de la Concepción. La actividad detectada es debida a la presencia de radionucleidos de origen natural pertenecientes a las series radiactivas del ^{238}U , ^{235}U y ^{232}Th .

La actividad total detectada es baja en comparación con otros balnearios estudiados.

La actividad debida a la presencia de ^{222}Rn en las aguas de este balneario es baja, inferior a los valores habituales encontrados en aguas subterráneas, tanto en España como en otros países, como corresponde a zonas geográficas con suelos sedimentarios.

TABLA 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO RADIOLÓGICO DEL BALNEARIO DE BAÑOS DE LA CONCEPCIÓN.

ENSAYO	MANANTIAL	FUENTE	Media
	Actividad (Bq/L)	Actividad (Bq/L)	Actividad (Bq/L)
Alfa total	0,273 ± 0,082	0,228 ± 0,066	0,250 ± 0,007
Beta total	0,177 ± 0,032	0,179 ± 0,035	0,18 ± 0,034
Rn-222	0,0135 ± 0,00051	0,0583 ± 0,00057	0,036 ± 0,00054
Pb-210	0,0082 ± 0,017	0,0061 ± 0,0018	0,0071 ± 0,00175
Po-210	0,0044 ± 0,00094	0,0035 ± 0,0014	0,0040 ± 0,0011
Ra-226	0,079 ± 0,014	0,075 ± 0,013	0,077 ± 0,013
Th-232	0,0080 ± 0,0019	ACT. NO DETECTABLE	
Th-230	0,018 ± 0,0042	0,0093 ± 0,023	0,014 ± 0,013
Th-228	0,013 ± 0,0031	0,012 ± 0,0030	0,012 ± 0,003
Tritio	ACT. NO DETECTABLE	0,00015 ± 0,000032	
U-238	0,018 ± 0,0021	0,018 ± 0,0027	0,014 ± 0,0024
U-235	0,0073 ± 0,00038	0,00078 ± 0,00055	0,0007 ± 0,00047
U-234	0,042 ± 0,0037	0,038 ± 0,0043	0,045 ± 0,0040

Como ocurre en la mayoría de los balnearios estudiados, el valor de actividad alfa total (0,25 Bq/L) supera el establecido en el BOE del 21 de Febrero de 2003, como nivel máximo permitido para aguas potables (0,1 Bq/L), aunque no aplica en el caso de aguas naturales minero-medicinales.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que las aguas del Balneario de Baños de la Concepción tienen valores bajos de radiactividad de entre los estudiados hasta la fecha.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Trinidad, J. A. & Suárez A. M. (2009) Determinación de la actividad alfa total en aguas por centelleo sólido. (RA/PT-Ey01, 2ª Ed). Dpto. de Medio Ambiente. CIEMAT.
2. Determinación del índice de actividad beta total en aguas mediante contador proporcional. UNE 73311-4 (2002).
3. Pozuelo, M. (2002) Procedimiento de determinación de emisores gamma en muestras ambientales. (PE-IA-LRA-07). Dpto. de Impacto Ambiental de la Energía CIEMAT.
4. Gómez, V., Heras, M. C. & García M. R. (1994) Procedimiento para la determinación de Ra-226 y Ra-224 en aguas y en suelos, mediante separación radioquímica y posterior medida alfa con contador proporcional reflujo continuo de gas o contador de centelleo. (PR-X2-04, 1ª Ed). Dpto. de Impacto Ambiental de la Energía CIEMAT.
5. Heras, M. C., Gómez, V., García, M. R., Pozuelo, M. & Gracia, J. A. (1996) Procedimiento para la separación radioquímica y determinación mediante espectrometría alfa de uranio en aguas, suelos, sedimentos y muestras biológicas. (PR-X2-09). Dpto. de Impacto Ambiental de la Energía CIEMAT.
6. Pozuelo, M. (2002) Procedimiento para la determinación de Th-230 en aguas por espectrometría alfa. (PE-IA-LRA-09, 1ª Ed.). Dpto. de Impacto Ambiental de la Energía CIEMAT.
7. García, M. R. (1996) Procedimiento para la determinación de Pb-210 en aguas. (PR-X2-05). Dpto. de Impacto Ambiental de la Energía CIEMAT.
8. Gascó, C. (2006) Determinación de Po-210 en agua potable. (PT-IA/RA-TU06). Dpto. de Medio Ambiente. CIEMAT.
9. Simón, M. A., Romero del Hombrebueno, B. & Larena, P. (2004) Determinación de tritio en aguas por centelleo líquido con concentración electrolítica previa. (PT-IA/RA-CL01, 1ª Ed.). Dpto. de Medio Ambiente. CIEMAT.
10. Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (2003). Real Decreto 140/2003, BOE nº 45: 7228-7245.

CAPÍTULO IV

MICROBIOLOGÍA DE LOS MANANTIALES MINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO DE BAÑOS DE LA CONCEPCIÓN

M^a Ángeles Mosso Romeo, M^a Carmen de la Rosa Jorge*.

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

RESUMEN

Se han estudiado tres manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción (Albacete). El número total de microorganismos en el agua ha sido de $5,2 \times 10^5$ /mL, la mayoría vivos (92,7%). El número de bacterias heterótrofas y oligotrofas viables a 22 °C y 37 °C ha sido inferior a 20 ufc/mL. Las cepas aisladas corresponden, principalmente, a bacilos Gram negativos (60%) de la clase *Gammaproteobacteria* y, en menor proporción, a bacilos (29,6%) y cocos Gram positivos (10,4%). No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos. Se han detectado bacterias amonificantes, proteolíticas, amilolíticas, nitrificantes, sulfato-reductoras y halófilas, así como hongos en 100 mL de agua. También se estudiaron los biotapetes formados en el manantial La Fuente, constituidos por una asociación de cianobacterias filamentosas (*Lyngbya*) y esféricas (*Cyanothece*, *Synechococcus*), bacterias fototrofas filamentosas (*Chloroflexus*) y diatomeas (*Navicula*).

Palabras clave: Manantiales termales; Balneario de Baños de la Concepción; Microbiota autóctona; Biodiversidad; Biotapetes.

ABSTRACT

Microbiology of the mineral springs of Baños de la Concepción spa

Three mineral springs have been studied in the Spa Baños de la Concepción (Albacete). The total number of microorganisms present in the water was of 5.2×10^5 /mL, being the majority alive (92.7%). The number of viable heterotrophic and oligotrophic bacteria, at 22° C and 37° C, was lower than 20 cfu/mL. The strains of the heterotrophic bacteria isolated predominantly correspond to Gram-negative bacilli (60%), belonging to the Class *Gammaproteobacteria* and in smaller proportion to Gram-positive bacilli (29.6%) and cocci (10.4%). Neither faecal indicators nor pathogenic microorganisms were found. On the other hand, ammonifying, proteolytic, amylolytic, nitrifying, sulphate-reducing and halophilic bacteria as well as fungi were detected in 100 mL of water. The microbial mats of

La Fuente spring were studied as well. This mats consist of an association of filamentous cyanobacteria (*Lyngbya*), sphaeric cyanobacteria (*Cyanothece*, *Synechococcus*), filamentous phototrophic bacteria (*Chloroflexus*) and diatoms (*Navicula*).

Keywords: Thermal springs; Baños de la Concepción spa; Autochthona microbiota; Biodiversity; Microbial mats.

1. INTRODUCCIÓN

El Balneario de Baños de la Concepción pertenece al término municipal de Villatoya, en la provincia de Albacete. Se encuentra situado en la comarca de La Manchuela, localizada en el extremo oriental de la provincia en el límite con la de Valencia, por donde discurre el valle del río Cabriel. Se ubica sobre un terreno accidentado con una frondosa vegetación formada por extensos pinares.

En la zona emergen varios manantiales de aguas termales que pudieron ser utilizados desde tiempos de los romanos, aunque las primeras noticias de su uso son del siglo XVIII (1). Según Sánchez (2) estas aguas fueron declaradas de utilidad pública en 1843, sin embargo la disposición oficial data de 1845 (3). En este año el médico director Genovés y Tamarit (4) describe las características físicas del manantial de Los Baños con las siguientes palabras: “...sumamente transparentes y cristalinas, blandas, untosas y suaves, sin color ni olor alguno; su sabor es ligeramente astringente; en los regueros por donde pasan tiñen de color verdoso y ocre algunas piedras, y en las rebalsas forman una película plateada con los colores del iris... tomadas en un vaso se ven muchas burbujas...”.

El Balneario estuvo en funcionamiento durante casi cien años, hasta los años cuarenta del pasado siglo, sufriendo un abandono hasta los años noventa en que fue reconstruido, utilizándose para tratamientos terapéuticos hasta la actualidad.

Los objetivos de este estudio han sido dos: primero determinar los microorganismos de interés sanitario que pudieran suponer un riesgo para la salud de los usuarios que reciben los tratamientos terapéuticos en el Balneario. Los microorganismos investigados son los indicadores de contaminación fecal y algunos patógenos que se transmiten a través del agua. En segundo lugar, se han caracterizado, por primera vez en estas aguas mineromedicinales, la microbiota autóctona de estos manantiales que depende de las condiciones físicas y químicas de los mismos. También se han detectado sus actividades metabólicas en los ciclos biogeoquímicos, por su importante papel en la autodepuración de las aguas.

Además se han estudiado los biotapetes que se originan en el vaso del manantial de La Fuente y que están formados por comunidades microbianas complejas.

2. RESULTADOS

2.1. MANANTIALES

El Balneario, en la actualidad, (Figura 1) utiliza tres manantiales mineromedicinales denominados Los Baños, La Fuente y Las Cuevas. El punto de emergencia del manantial Baños se encuentra protegido por una pequeña edificación y es el que se emplea para los tratamientos terapéuticos (Figura 2a). El manantial La Fuente emerge en el jardín del Balneario y a través de una artística fuente de siete caños se utiliza para tratamientos hidropínicos (Figura 2b). El manantial Las Cuevas está ubicado en el interior del edificio del Balneario y solamente se utiliza cuando es necesario un mayor caudal para los tratamientos tópicos (Figura 2c). Estas aguas mineromedicinales emergen a una temperatura de 28 °C, tienen un pH de 7,9 y se clasifican como de mineralización media, con

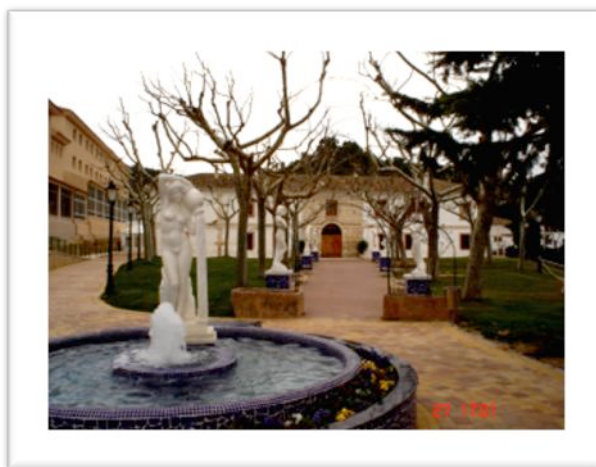


FIGURA 1. EDIFICIOS DEL BALNEARIO

predominio de sulfato, cloruro, calcio, magnesio y sodio (5, 6).

Para realizar este estudio se han tomado muestras de agua en los puntos de emergencia de los tres manantiales, en dos épocas del año 2010, febrero y mayo. Las muestras se recogieron 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 el vaso de la fuente del manantial La Fuente.

2.2. MICROORGANISMOS TOTALES Y VIVOS

La gran diversidad de ambientes acuáticos propicia que en estos hábitats se encuentre una microbiota autóctona muy variada, en tamaño, estado fisiológico y actividad metabólica. Para determinar el número y la morfología de todos los microorganismos presentes en las aguas es necesario realizar el recuento directo con un microscopio de fluorescencia, utilizando varios fluorocromos que nos permiten distinguir los microorganismos muertos de los vivos.

Los colorantes empleados en esta investigación han sido: syto 9 y yoduro de propidio del “kit” “BacLight Live/Dead” (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Las muestras teñidas se filtraron por 0,2 μm 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 (7).

El número de microorganismos totales ha sido de $6,9 \times 10^5/\text{mL}$ en el manantial Baños; $3,3 \times 10^5/\text{mL}$ en el manantial La Fuente y $5,3 \times 10^5/\text{mL}$ en el manantial Las Cuevas, estando la mayoría vivos, 89,9%, 93,9% y 94,3%, respectivamente. Estos resultados son semejantes a los encontrados en otros manantiales de aguas mineromedicinales sulfatadas (8). El número de microorganismos totales, obtenido al microscopio, es siempre superior al número de viables, obtenido por cultivo, en dos a cuatro unidades logarítmicas, debido a que se contabilizan todos los microorganismos presentes, incluso los muertos. Además muchas 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, algunas se encuentran en el estado de viable no cultivable (9).



FIGURA 2. PUNTOS DE EMERGENCIA DE LOS MANANTIALES. A) LAS BOMBAS; B) LA FUENTE; C) LAS CUEVAS.

2.3. BACTERIAS AEROBIAS VIABLES Y ESPORULADAS

El recuento de bacterias aerobias viables y esporuladas se ha realizado por las técnicas de filtración (filtros de 0,22 μm) y dilución en placa. Se han utilizado los medios agar extracto de levadura (10) para las heterótrofas y agar R₂A (11) para las oligotrofas, incubando a 22 °C, cinco días y a 37 °C, 48 horas. Para el recuento de bacterias esporuladas se han utilizado las mismas técnicas que para viables y el medio de cultivo agar extracto de levadura con 0,1% de almidón. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro de agua (ufc/mL).

Este tipo de recuento se realiza desde los inicios de la Microbiología, a finales del siglo XIX, para determinar la calidad sanitaria de las aguas utilizadas en el consumo humano. En las aguas mineromedicinales, de origen subterráneo, es útil para detectar la contaminación microbiana del acuífero procedente de las aguas superficiales. En el punto de emergencia de los tres manantiales, el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables ha sido muy bajo, inferior a 20 ufc/mL, lo que significa que la protección de los manantiales es adecuada (Tabla 1). Los manantiales no presentan diferencias significativas en el número de bacterias oligotrofas y heterótrofas. Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles mesotermales (12).

TABLA 1. NÚMERO DE BACTERIAS AEROBIAS VIABLES Y ESPORULADAS (UFC/ML).

Bacterias	Manantiales			
	T ^a (°C)	Las Bombas	La Fuente	Las Cuevas
Heterótrofas	22 ^o	9	2	4
	37 ^o	2	< 1	3
Oligotrofas	22 ^o	12	3	7
	37 ^o	9	1	6
Esporuladas	22 ^o	1	1	5
	37 ^o	1	< 1	1

2.4. MICROORGANISMOS DE INTERÉS SANITARIO

Las aguas mineromedicinales se emplean en los balnearios para tratamientos terapéuticos, por lo que es necesario un control microbiológico periódico, para evitar cualquier riesgo sanitario asociado a la presencia de microorganismos patógenos, que puedan transmitirse a través del agua por las vías más frecuentes de aplicación: oral, respiratoria o tópica.

Para detectar la posible presencia de indicadores fecales se han realizado los recuentos de coliformes totales, coliformes fecales, enterococos, esporas de *Clostridium* sulfito-reductores y *C. perfringens* y la presencia de *Escherichia coli*, además se han investigado *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando los métodos oficiales de las aguas de consumo humano (10) y de bebida envasadas (13). 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 (14) 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 (15).

Los tres manantiales estudiados no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium* sulfito-reductores ni *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 (10, 16).

2.5. MICROORGANISMOS DE INTERÉS ECOLÓGICO

Las aguas minerales naturales presentan comunidades microbianas autóctonas de gran interés ecológico ya que participan en los procesos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre. Estos microorganismos poseen diversas capacidades metabólicas, transformando los compuestos orgánicos en inorgánicos lo que contribuye a la autodepuración de las aguas y mantiene el equilibrio biológico de estos ambientes hidrotermales (17, 18).

Para alcanzar uno de los objetivos propuestos en este estudio se ha determinado el número de bacterias que intervienen en el ciclo del carbono (proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas), del nitrógeno (amonificantes, nitrificantes) y del azufre (sulfato-reductoras). Se ha utilizado la técnica del número más probable (NMP) y los medios descritos por Pochon y Tardieux (19) para las bacterias del ciclo del carbono y del nitrógeno, y por Rodina (20) 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).

Los tres manantiales presentan bacterias proteolíticas, amilolíticas y amonificantes en valores medios; nitrificantes y sulfato-reductoras en número bajo. En el manantial Las Bombas además, se han detectado bacterias celulolíticas en número muy bajo. Los microorganismos con enzimas proteolíticos, amilolíticos y amonificantes son muy abundantes en los hábitats naturales y tienen un papel importante en la eliminación de materia orgánica en las aguas subterráneas,

habiéndose encontrado en numerosos manantiales mineromedicinales (8, 12, 21-23). Las bacterias nitrificantes no suelen detectarse en este tipo de aguas o se encuentran en un número muy bajo (22, 24).

Estas aguas contienen sulfatos por lo que se han encontrado bacterias sulfato-reductoras que intervienen en el ciclo del azufre reduciendo los sulfatos a sulfhídrico que es oxidado por una gran variedad de microorganismos convirtiéndolo en azufre elemental y contribuyendo a la deposición biológica de este elemento. Se han detectado en número escaso en otros manantiales sulfatados (8, 24).

Debido a que estas aguas son de mineralización media se han estudiado los microorganismos capaces de crecer a concentraciones elevadas de sal. 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). El manantial Las Cuevas presenta un número pequeño de bacterias halófilas facultativas que se han identificado como *Staphylococcus* y *Bacillus*. Estas bacterias se encuentran en ambientes salinos y se han detectado en otros manantiales de mineralización media (21, 24) y fuerte (8, 23).

También se han estudiado otros tipos de microorganismos constituyentes de la microbiota autóctona de estos manantiales: hongos, cianobacterias y algas. La presencia de algas y cianobacterias se ha determinado filtrando 100 mL e inoculando el filtro en medio Stanier (26), incubando con iluminación controlada a 24 °C, durante 30 días. No se han detectado cianobacterias ni algas en ninguna muestra de agua.

El recuento de hongos se realizó por el método de filtración, utilizando el medio agar Sabouraud con cloranfenicol al 0,05% (14). La identificación se ha realizado siguiendo los criterios de Pitt y Hocking (27). Los hongos filamentosos se han encontrado, principalmente, en el manantial Las Cuevas (Tabla 2) y pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Acremonium* y *Alternaria*. Las cepas aisladas son capaces de crecer en medios de cultivo con cloruro sódico (15%) por lo que también se han detectado en el estudio de los microorganismos halófilos moderados. La presencia de mohos en aguas minerales es poco frecuente ya que proceden del suelo pero se adaptan a las condiciones de estos hábitats y estos géneros se han encontrado en otros manantiales mineromedicinales (8, 21-23).

TABLA 2. NÚMERO DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS ECOLÓGICO.

Microorganismos	Manantiales		
	Las Bombas	La Fuente	Las Cuevas
NMP/100 mL			
Proteolíticos	2,4 x 10 ²	4,6 x 10 ²	2,4 x 10 ²
Amilolíticos	4,6 x 10 ³	2,4 x 10 ²	4,6 x 10 ²
Celulolíticos	9,3 x 10	-	-
Nitrificantes	1,2 x 10 ²	9,1	1,5 x 10
Amonificantes	4,6 x 10 ³	4,6 x 10 ³	2,4 x 10 ³
Sulfato Reductores	1,5 x 10	9,1	3
ufc/100 mL			
Halófilos	1	-	37
Hongos	5	-	26

2.6. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS

Las cepas aisladas en los distintos medios de recuento se han identificado por las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, utilizando los métodos de Cowan y Steel (28). 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 (29-31).

En los tres manantiales se han aislado 135 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (60%), bacilos Gram positivos (29,6%) y cocos Gram positivos (10,4%). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (30, 31) las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al *Phylum Proteobacteria* (60%), y en menor proporción a los *Phyla: Actinobacteria* (25,9%), y *Firmicutes* (14,1%) (Figura 3). La mayoría de los bacilos Gram negativos aislados pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (49,4%). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en aguas minerales envasadas (32) y manantiales minerales (12, 22, 23, 33).

En estos manantiales se han aislado un gran número de cepas de bacterias pigmentadas, principalmente con pigmentos amarillos y naranjas (Figura 4). Es frecuente la presencia de este tipo de bacterias en aguas minerales (34), debido a que los pigmentos carotenoides las protegen de las radiaciones evitando la muerte fotodinámica (30). De todas ellas, destacamos dos cepas de *Janthinobacterium lividum*, aisladas en el manantial Las Bombas. Esta especie produce un pigmento violeta (violaceína) de gran interés, actualmente, por sus propiedades antimicrobianas y antitumorales que pueden tener aplicación farmacológica (35).

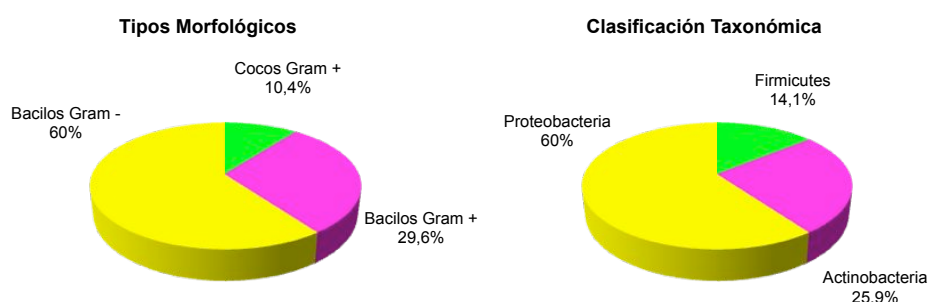


FIGURA 3. DIVERSIDAD DE BACTERIAS HETERÓTROFAS (% DE CEPAS).

En los bacilos Gram negativos, el género *Pseudomonas*, junto con otros géneros muy próximos desde el punto de vista taxonómico, han sido muy frecuentes (Tabla 3). Este género también es predominante en aguas minerales envasadas (32, 36, 37) y en manantiales minerales (12, 21, 23, 38). Estos microorganismos tienen unos requerimientos nutricionales escasos y una diversidad metabólica que les permite utilizar muy diversas fuentes de carbono, por esto son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ambientes oligotróficos como las aguas mineromedicinales. La especie *Sphingomonas paucimobilis* ha sido aislada en los tres manantiales (Tabla 3). Esta especie es autóctona de hábitats naturales (30), produce pigmentos amarillos carotenoides y degrada hidrocarburos aromáticos (39) y ha sido aislada en otros manantiales mineromedicinales (21)

En el manantial Las Bombas se han aislado, de los cultivos de enriquecimiento de Enterobacterias, seis cepas de *Enterobacter cloacae*. Estas cepas fermentan la lactosa lentamente por lo que no se han detectado en el recuento de coliformes. El género *Enterobacter*, ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentra con frecuencia en aguas minerales naturales y mineromedicinales (21, 40).



FIGURA 4. BACTERIAS PIGMENTADAS.

Los bacilos Gram positivos se han encontrado en mayor proporción en los manantiales La Fuente y Las Cuevas (Tabla 4). La mayoría de 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 (8) y mesotermales (23, 24). *Leifsonia aquatica* (antes *Corynebacterium aquaticum*) es propia de ambientes acuáticos y se ha detectado en otros manantiales mineromedicinales (22, 23). *Rhodococcus* es muy resistente a los ambientes extremos ya que posee ácidos micólicos y también se ha aislado de otros manantiales (8, 12, 21, 23). También se han detectado un pequeño número de cepas de bacilos Gram positivos esporulados del género *Bacillus*. Estas bacterias proceden del suelo y se han encontrado en manantiales minerales termales (22, 24, 41).

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden principalmente al género *Staphylococcus* (Tabla 4). Las cepas aisladas son halófilas facultativas y pueden vivir en concentraciones elevadas de sal. Estas bacterias son muy ubicuas y se han detectado en aguas mineromedicinales (8, 12, 23).

Se han observado algunas diferencias entre la microbiota autóctona de los tres manantiales estudiados. El manantial Las Bombas es el que presenta una mayor biodiversidad ya que se han aislado 26 especies distintas, predominando los bacilos Gram negativos de las especies *Enterobacter cloacae* (9,6%) y *Pseudomonas putida* (8,0%), mientras que en los manantiales La Fuente y Las Cuevas son más frecuentes las bacterias Gram positivas del género *Rhodococcus* (16,6%) y *Bacillus* (17,9%), respectivamente (Tablas 3 y 4). Otros autores también han encontrado un predominio de estos géneros de bacilos Gram positivos en aguas subterráneas alcalinas (42).

TABLA 3. GÉNEROS Y ESPECIES DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y OLIGOTROFAS GRAM NEGATIVAS (% CEPAS).

Bacterias Gram negativas	Manantiales		
	Las Bombas N=60	La Fuente N=36	Las Cuevas N=39
No fermentadoras	40,0	36,2	41,0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,6	-	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	2,7	-
<i>Alcaligenes</i> spp	1,6	-	-
<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	-	2,5
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1,6	-	2,5
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	10,8	2,5
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1,6	-	-
<i>Janthinobacterium lividum</i>	3,2	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4,8	-	5,1
<i>Pseudomonas luteola</i>	1,6	-	2,5
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1,6	8,2	-
<i>Pseudomonas putida</i>	8,0	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3,2	-	2,5
<i>Ralstonia pickettii</i>	1,6	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	4,8	5,4	2,5
No identificadas	3,2	8,1	20,5
Fermentadoras			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	38,4	8,1	5,1
<i>Edwardsiella tarda</i>	6,4	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,6	-	-
<i>Pantoea</i> spp	9,6	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	2,5
<i>Serratia</i> spp	1,6	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	3,2	-	-
<i>Serratia plymuthica</i>	3,2	-	-
No identificadas	-	2,7	2,5
	11,6	5,4	-

TABLA 4. GÉNEROS Y ESPECIES DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y OLIGOTROFAS GRAM POSITIVAS (% CEPAS).

Bacterias Gram positivas	Manantiales		
	Las Bombas N=60	La Fuente N=36	Las Cuevas N=39
Bacilos	15,0	47,3	35,9
<i>Agromyces</i>	-	2,7	-
<i>Arthrobacter</i>	1,6	2,7	5,1
<i>Aureobacterium</i>	-	2,7	-
<i>Bacillus</i>	4,8	-	17,9
<i>Brevibacterium</i>	1,6	5,4	2,5
<i>Cellulomonas</i>	3,2	-	-
<i>Corynebacterium</i>	-	2,7	-
<i>Leifsonia aquatica</i>	-	10,8	2,5
<i>Rhodococcus</i>	-	16,6	-
No Identificados	3,2	2,7	7,7
Cocos	6,5	8,2	17,9
<i>Kocuria rosea</i>	1,6	2,7	-
<i>Kocuria varians</i>	-	-	2,5
<i>Micrococcus</i>	1,6	-	2,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	2,5
<i>S. hominis</i>	-	-	5,1
<i>S. lugdunensis</i>	-	2,7	-
<i>S. sciuri</i>	-	-	2,5
<i>S. warneri</i>	1,6	2,7	-
<i>S. xylosus</i>	1,6	-	2,5

2.7. BIOTAPETES

Se han tomado muestras de los tapetes microbianos formados en la pared de mármol del vaso de la fuente donde emerge el agua del manantial del mismo nombre (Figura 5). 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. Los biotapetes adheridos a superficies 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 procariotas y eucariotas muchos de ellos fotosintéticos y filamentosos (cianobacterias, algas), en donde se alojan otros organismos unicelulares que producen exopolímeros, que unen los microorganismos y los protegen de los agentes externos y permiten la interacción entre las células.

Esas poblaciones comparten los nutrientes, aportando diferentes enzimas que metabolizan diversos compuestos (43).

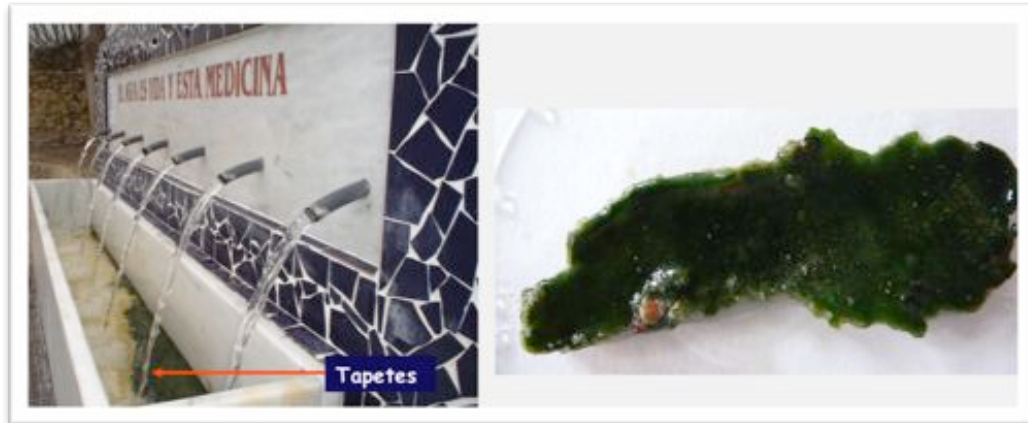


FIGURA 5. BIOTAPETES DEL MANANTIAL LA FUENTE.

Los biotapetes estudiados 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 del género *Lyngbya*. En menor proporción, se encuentran bacterias fototrofas filamentosas del género *Chloroflexus* que presentan autofluorescencia roja con luz ultravioleta, debido a los pigmentos clorofílicos que poseen (Figura 6). Las cianobacterias esféricas pertenecen al género *Synechococcus* y *Cyanothece*, además se observan abundantes diatomeas (*Navicula*) (Figura 6).

Las comunidades microbianas que constituyen estos tapetes son semejantes a las encontradas en los que forman algunos manantiales mineromedicinales españoles (23, 24) y manantiales termales de diferentes partes del mundo (44-46).

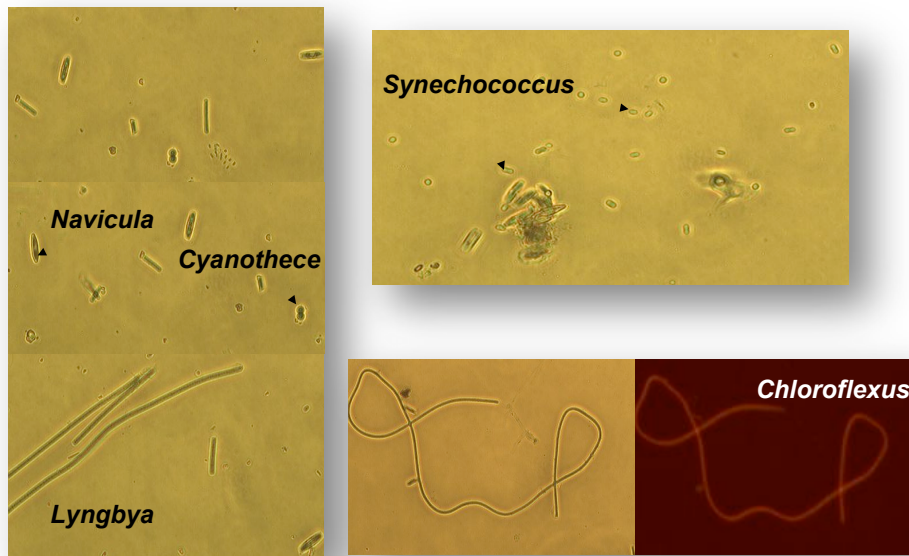


FIGURA 6. BIOTAPETES POR MICROSCOPÍA DE CONTRASTE DE FASES Y FLUORESCENCIA (40X).

3. CONCLUSIONES

Los manantiales presentan un número bajo de bacterias viables, menos de 20/mL, lo que indica una protección adecuada de los manantiales. No se han detectado indicadores de contaminación fecal 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 del *Phylum Proteobacteria* lo que es habitual en los manantiales hipotermales. 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 al propietario del Balneario D. Antonio Granero y en particular al gerente D. Antonio Calomarde, todas las atenciones que han tenido con ellas durante sus estancias en el establecimiento, así como las facilidades dadas para la toma de muestras en los dos muestreos realizados. Además queremos agradecer la ayuda en el trabajo de laboratorio llevada a cabo por la Licenciada Doña Mónica Pacheco y la alumna Doña Ana Pérez. Así mismo a las profesoras Doña Concepción Pintado y Doña Carmina Rodríguez por su ayuda en la realización de este trabajo.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Almendros, J. M. (2004) El Balneario de la Concepción de Villatoya. Hidrologías Médicas del siglo XIX. Instituto de estudios albacetenses "Don Juan Manuel". Serie I- Estudios- Nº 141. Albacete.
2. Sánchez, J. (1992) Guía de establecimientos balnearios de España. Ministerio de Obras Públicas y Transporte. Madrid.
3. Francés, M. C. (2010) Historia y generalidades del Balneario de la Concepción. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 76 (E): E9-E39.
4. Genovés y Tamarit, J. (1845) Memoria sobre las aguas y baños ferruginosos de Villatoya. Impr. López y Cía. Valencia.
5. Maraver, F. & Armijo, F. (2010) Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. Ed. Complutense. Madrid.
6. Torija, E. (2010) Análisis físico-químico de las aguas del Balneario de la Concepción. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 76 (E): E57-E65.
7. Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. (1999) Live/Dead 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.
8. 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.
9. Oliver, J. D. (2005) The viable nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93-100.
10. 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.
11. 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.
12. De la Rosa, M. C., Sánchez, M. C., Rodríguez, C. & Mosso, M.A. (2007) Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73: 251-265.
13. 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.
14. Anónimo (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association. Washington.
15. Pelaz, C. & Martín, C. (1993) Legionelosis. Datos de España, diagnóstico de laboratorio y control en instalaciones de edificios. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
16. 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.
17. Chapelle, F. (2000) Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley and Sons. New York.
18. Leclerc, H. & Moreau, A. (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 207-222.
19. Pochon, J. & Tardieux, P. (1956) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle. St. Mandé (Seine).
20. Rodina, A. G. (1972) Methods in aquatic microbiology. University Park Press. Baltimore.
21. 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.

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., Pintado, C., Rodríguez, C. & Mosso, M. A. (2009) Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 75: 763-780.
24. 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.
25. Anónimo (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 14th edition. American Public Health Association. Washington.
26. Stanier, R., Adelberg, E. & Ingraham, J. (1984) Microbiología. Reverté. Barcelona.
27. Pitt, J. L. & Hocking, A. D. (1997) Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional. London.
28. Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993) Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. Cambridge.
29. Holt, J. G., Krieg, N., Sneath, D., Slaye, J. & Williams, S. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore.
30. Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N. & Slaye, J. (2005) Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Second Ed. Vol. II. The Proteobacteria. Part B and C. Springer. New York.
31. Whitman, W. (2009) Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Second Ed. Vol. III. The Firmicutes. Springer. New York.
32. Loy, A., Beiser, W. & Meier, H. (2005) Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3624-3632.
33. 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 Artic. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1532-1543.
34. Lee, J., Shin, Y., Yoon, J., Takeuchi, M., Pyun, Y. & Park, Y. (2001) *Sphingomonas aquatilis* sp. Nov., *Sphingomonas koreensis* sp. Nov. and *Sphingomonas taejonensis* sp. Nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1491-1498.
35. Hakvag, S., Fjaervik, E., Klinkenberg, G. *et al.* (2009) Violacein- producing *Collimonas* sp. from the Sea surface microlayer of costal waters in Trondelag, Norway. *Mar. Drugs.* 4: 576-588.
36. Elomari, M., Coroler, L., Izard, D. & Leclerc, H. (1995) A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 71-81.
37. Leclerc, H. & Da Costa. M. (2004) Microbiology of natural mineral waters. In: Technology of Bottled water. 2^a Ed. Blacwell Publishing. Boston.
38. Cousin, S., Brambilla, E., Yang, J. & Stackebrandt, E. (2008) Culturable aerobic bacteria from the upstream region of a karst water rivulet. *Int. Microbiol.* 11: 91-100.
39. Story, S. P., Kline, E. L., Hughes, T. A., Riley, M. B. & Hayasaka, S. S (2004) Degradation of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 168-176.
40. Jayasekara, N., Heard, G. M., Cox, J. M. & Fleet, G. H. (1998) Population of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. *Food Microbiol.* 15: 167-176.

41. Bel'kova, N. L., Parfenova, V. V., Suslova, T. & Tadzaki, K. (2005) Biodiversity and activity of the microbial community in the Kotelnikovsky hot spring (Lake Baikal). *Izv. Acad. Nauk. Ser. Biol.* 6: 664-671.
42. Tiago, I., Chung, A. P. & Verissimo, A. (2004) Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7378-87.
43. Zamora, A., de la Rosa, M. C., Mosso, M. A., Guijarro, J. F. & Rodríguez, C. (2009) Biofilmes, escenarios de biodiversidad. *San. Mil.* 65: 246-25.
44. McGregor, 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.
45. 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.
46. Portillo, M. C., Sririn, V., Kanoksilapatham, W. & González, J. M. (2009) Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles.* 13: 321-31.