

# ESTUDIO IV

## Análisis microbiológico de las aguas

---

- M. Carmen de la Rosa Jorge\*, Concepción Pintado García, Carmina Rodríguez Fernández, M. Ángeles Mosso Romeo

*Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid, España.  
delarosa@farm.ucm.es*

---

### RESUMEN

Se ha estudiado la microbiota autóctona y alóctona de las aguas mineromedicinales del Balneario “El Raposo” (Badajoz). El número total de microorganismos en el agua ha sido de  $9,1 \times 10^4$ /mL, la mayoría vivos (70,3 %). No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos por lo que estas aguas cumplen con la normativa española de aguas de consumo. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacterias oligotróficas aerobias Gram negativas (73%) de la clase Gammaproteobacteria y, en menor proporción, por bacilos (23,5%) y cocos Gram positivos (3,5%). Se han detectado bacterias con actividades amonificantes, proteolíticas, amilolíticas, y celulolíticas así como hongos en 100 mL de agua. También se estudiaron los biotapetes formados en los canales del jardín del Balneario, constituidos por una asociación de algas verdes, cianobacterias filamentosas y esféricas y diatomeas.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Balneario de “El Raposo” pertenece al término municipal de Puebla de Sancho Pérez, provincia de Badajoz, en la comunidad autónoma de Extremadura. Se encuentra situado en la comarca de Zafra- Río Bodión, en la antigua Ruta de la Plata. Se ubica sobre un terreno llano, a 535m de altitud, a orillas del arroyo El Raposo.

Estas aguas fueron declaradas de utilidad pública en 1926 (1) aunque ya se utilizaban en el último tercio del siglo XIX. Actualmente el Balneario dispone de modernas instalaciones para los distintos tratamientos termales y de un hotel recientemente reformado. El conjunto está enclavado en un frondoso y extenso jardín (Figura 1).



**Figura 1.-** Edificio y jardines del balneario “El Raposo”.

En este trabajo se han estudiado los microorganismos de interés sanitario que pudieran suponer un riesgo para la salud de los usuarios que reciben los tratamientos terapéuticos en el Balneario, como son los indicadores de contaminación fecal y algunos patógenos que se transmiten a través del agua. Además, se ha caracterizado, por primera vez en estas aguas mineromedicinales, la microbiota autóctona de estos manantiales que depende de las propiedades físicas y químicas de los mismos, así como sus actividades metabólicas en los ciclos biogeoquímicos, por su importante papel en la autodepuración de

las aguas. También se han estudiado los biotapetes que se forman en los canales que se encuentran en el jardín del Balneario y que están constituidos por diversas comunidades microbianas.

## 2. RESULTADOS

### 2.1. Manantiales

El Balneario utiliza principalmente un manantial mineromedicinal y, en caso necesario, el agua de dos sondeos. El punto de emergencia del manantial se encuentra en el interior del Balneario, surge de una galería de captación de unos 50 m de longitud, excavada en la roca y embovedada de ladrillos, protegido por una tapa de cristal (Figura 2 a, b). El sondeo 1, que es el que más se utiliza, está situado en el exterior del edificio del Balneario a unos 60m de profundidad (Figura 2c). Ambas captaciones se conducen, mediante tuberías a unos depósitos de acero inoxidable donde se mezclan (Figura 2d). Estas aguas mineromedicinales emergen a una temperatura de 17 °C, tienen un pH neutro y se clasifican como hipotermales, de mineralización media, con predominio de bicarbonato, cloruro, calcio y sodio (2).

Para realizar este estudio se tomaron muestras de agua procedentes del punto de emergencia del manantial y del sondeo 1, en marzo del año 2011. 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 analizándolas antes de las 24 horas. Además se tomaron, en recipientes estériles, los biotapetes formados en los canales del jardín del Balneario.



**Figura 2.-** Puntos de emergencia. a, b) manantial; c) sondeo; d) depósitos.

## 2.2. Microorganismos totales y vivos

En los hábitats acuáticos vive una microbiota autóctona muy variada, tanto en tamaño y estado fisiológico como en actividad metabólica. Para determinar el número y la morfología de todos los microorganismos presentes en estos ambientes, la técnica más adecuada es 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: naranja de acridina, Syto<sup>®</sup> 9 y yoduro de propidio del kit “BacLight Live/Dead”. Las muestras teñidas se filtraron a través de una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro 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 (3).

El número de microorganismos totales ha sido de  $8,5 \times 10^4/\text{mL}$  en el manantial y  $9,8 \times 10^4/\text{mL}$  en el sondeo, estando la mayoría vivos, 67,2 % y 72,4 %, respectivamente.

Estos resultados son semejantes a los encontrados en otros manantiales de aguas mineromedicinales hipotermales, bicarbonatados (4,5). El recuento de microorganismos totales, observado al microscopio, es siempre superior al de viables, obtenido por cultivo, en dos a cuatro unidades logarítmicas, debido a que se contabilizan todos los microorganismos presentes, incluso los muertos.

### 2.3. Bacterias aerobias viables y esporuladas

Para detectar una posible contaminación microbiana del acuífero, procedente de las aguas superficiales, es útil determinar el número de bacterias aerobias viables en las aguas mineromedicinales de origen subterráneo. El recuento de estas bacterias se realizó por las técnicas de filtración (filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y dilución en placa, utilizando los medios agar extracto de levadura (6) para las bacterias heterótrofas y agar R<sub>2</sub>A (7) para las oligotrofas, e incubando a 22 °C, cinco días y a 37 °C, 48 horas. Para el recuento de bacterias esporuladas se calentó la muestra a 80 °C, 10 minutos, sembrando por los mismos métodos, y utilizando 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).

En el punto de emergencia del manantial, el número de bacterias heterótrofas y esporuladas es muy bajo, lo que significa que la protección del manantial es adecuada (Tabla 1).

Tanto el manantial como el sondeo presentan más bacterias oligotrofas que heterótrofas, propio de ambientes acuáticos pobres en materia orgánica (8). Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles hipotermales (9). La diferencia entre los recuentos de microorganismos vivos observados con microscopio de fluorescencia y de bacterias viables, obtenidos por cultivo, se debe a que muchas de las bacterias presentes 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 (10).

**Tabla 1.-** Número de bacterias aerobias viables y esporuladas (ufc/mL).

T <sup>a</sup> (° C)	Bacterias	Manantial	Sondeo
22°	<b>Heterótrofas</b>	34	128
37°		5	65
22°	<b>Oligotrofas</b>	204	221
37°		78	148
22°	<b>Esporuladas</b>	6	5
37°		2	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 de aplicación utilizadas: 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 (6) y de bebida envasadas (11). 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 (12) e incubando a 37 °C, 48 horas. La investigación de *Legionella pneumophila* se ha hecho según la Norma ISO 11731, utilizando la técnica de filtración (13).

Las muestras estudiadas no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium* sulfito-reductores ni *Clostridium perfringens*) en 100 mL de agua, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano (6).



Tampoco se han encontrado bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua. Se han detectado coliformes totales en número bajo, menos de 10 por 100 mL. Las especies identificadas proceden del suelo y no indican contaminación fecal.

## 2.5. Microorganismos de interés ecológico

La microbiota autóctona de las aguas mineromedicinales es de gran interés ecológico ya que participa 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, así mismo provee de nutrientes a las plantas y otros seres vivos, manteniendo el equilibrio biológico de estos ambientes hidrotermales (8).

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 (14) para las bacterias del ciclo del carbono y del nitrógeno, y por Rodina (15) 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 en 100 mL de agua (Tabla 2).

Estas aguas presentan bacterias proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas, amonificantes y nitrificantes. Los microorganismos con actividades proteolíticas, amilolíticas y amonificantes son muy abundantes en los hábitats naturales y son importantes en la eliminación de materia orgánica, en las aguas subterráneas, habiéndose encontrado en varios manantiales hipotermas (5,9,16). Las bacterias celulolíticas y nitrificantes no suelen detectarse en este tipo de aguas o se encuentran en un número muy bajo (5,16,17).

**Tabla 2.-** Número de microorganismos de interés ecológico.

Microorganismos	Manantial	Sondeo
<b>NMP/100mL</b>		
Proteolíticos	$4,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10$
Amilolíticos	$1,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
Celulolíticos	$3,8 \times 10$	3
Amonificantes	$>1,4 \times 10^4$	$>1,4 \times 10^4$
Nitrificantes	$1,6 \times 10$	$1,1 \times 10$
Sulfato-reductores	3,6	-
<b>ufc/100mL</b>		
Halófilos	$1,2 \times 10$	5
Hongos	$1,4 \times 10^3$	$5 \times 10$

En el manantial, además, se han encontrado bacterias sulfato-reductoras del género *Desulfovibrio* en número muy bajo, debido, probablemente, a que el agua contiene una pequeña cantidad de sulfatos. Estas bacterias reducen estos sulfatos a sulfhídrico en condiciones anaerobias, por lo que su presencia en el agua no es frecuente, sin embargo se han detectado en algunos manantiales sulfatados (9,16,17).

Estas aguas son de mineralización media y poseen cloruros y sodio, por lo que se han estudiado los microorganismos halófilos moderados. Los recuentos se han realizado por la técnica de filtración, utilizando agar halófilo con 15 % de cloruro sódico (18), incubando a 30 °C, durante 7 días. Los resultados se han expresado como ufc por 100 mL de agua (Tabla 2). Las muestras presentan un número pequeño de bacterias halófilas facultativas, principalmente del género *Bacillus* y en menor proporción del género *Staphylococcus*. Estas bacterias se encuentran en ambientes salinos y se han detectado en otros manantiales de mineralización media (4,16,17).



También se han estudiado otros tipos de microorganismos constituyentes de la microbiota autóctona de estos manantiales: hongos, cianobacterias y algas.

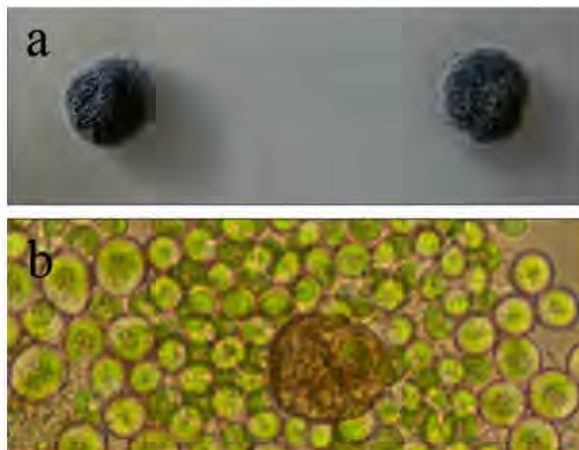


Figura 3.- a) Exophiala b) Chlorella.

El recuento de hongos se realizó por el método de filtración, utilizando el medio agar Sabouraud con cloranfenicol al 0,05 % (12). Los hongos filamentosos se han encontrado en mayor número en el manantial, (Tabla 2) y pertenecen principalmente al género *Exophiala* seguido de los géneros *Penicillium* y *Cladosporium*.

En el sondeo se ha detectado un pequeño número de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La presencia de mohos en aguas minerales es poco frecuente pero se han encontrado en otros manantiales mineromedicinales (5,17,19) ya que la mayoría proceden del suelo pero se adaptan a las condiciones de estos ambientes acuáticos. El género *Exophiala* es un hongo dematiáceo, de color negro y aspecto aterciopelado (Figura 3 a). Se han descrito varias especies, algunas de las cuales viven en el agua, donde se comportan como saprofitos (20).

La presencia de algas y cianobacterias se ha determinado filtrando 100 mL e inoculando el filtro en medio Stanier (21), incubando con iluminación controlada a 24° C, durante 30 días. No se han detectado cianobacterias en ninguna muestra de agua. El manantial presenta algas verdes unicelulares del género *Chlorella* (Figura 3b), frecuentes en todo tipo de aguas dulces pero, en aguas subterráneas, no crecen ya que necesitan la luz por ser microorganismos fotosintéticos.

## 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. Además se utilizó el sistema de identificación miniaturizado 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, las galerías 50CH para los esporulados y las galerías Staph para los cocos Gram positivos.

En las muestras estudiadas se han aislado 115 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (73 %), bacilos Gram positivos (23,5 %) y cocos Gram positivos (3,5 %) (Tabla 3). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (22,23) las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al *Phylum Proteobacteria* (64,7%), y en menor proporción a los *Phyla: Firmicutes* (21%), *Actinobacteria* (8,6%) y *Bacteroidetes* (5,7 %) (Tabla 4). La mayoría de los bacilos Gram negativos aislados son no fermentadores (55,6%) y pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (49,5%). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en otros manantiales minerales hipotermales (5, 16, 19, 24) y en aguas minerales envasadas (25).

No se han observado diferencias entre la microbiota autóctona del manantial y el sondeo aunque el manantial presenta una mayor proporción de bacilos Gram negativos fermentadores (Tabla 3).

En estos manantiales se han aislado un gran número de cepas de bacterias con pigmentos carotenoides (amarillos y naranjas) y fluorescentes. Es frecuente la presencia de este tipo de bacterias en aguas minerales (16, 26), debido a que los pigmentos carotenoides las protegen de las radiaciones evitando la muerte fotodinámica.

Entre ellas, destacamos en estas aguas dos especies: *Sphingomonas paucimobilis*, con pigmento carotenoide amarillo (Figura 4

a) y *Pseudomonas chlororaphis* que posee, además de un pigmento fluorescente, otro pigmento verde (clororafina), una fenazina que cristaliza alrededor de las colonias y que tiene acción antimicrobiana (Figura 4b).

Esta bacteria ha sido aislada de diversos orígenes (agua, suelo, rizosfera) (22), forma biofilmes y se utiliza en agricultura como un efectivo agente de control microbiológico frente a los hongos (27).



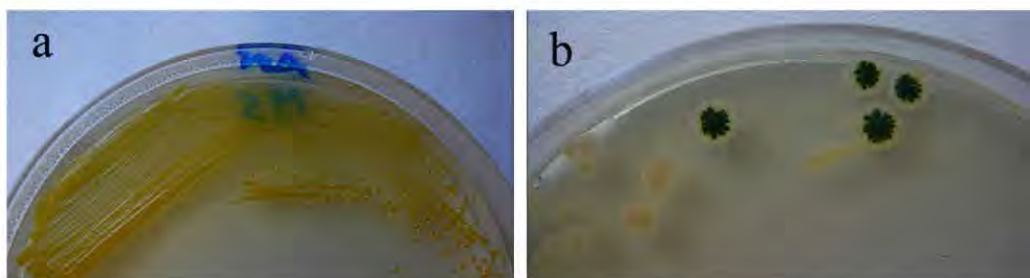


Figura 4.- Bacterias pigmentadas: a) *Sphingomonas paucimobilis* b) *Pseudomonas chlororaphis*.

Tabla 3.- Tipos morfológicos de bacterias (% cepas).

Bacterias	Manantial (n: 70)	Sondeo (n: 45)	Total (n:115)
<b>Bacilos Gram negativo</b>	<b>74,3</b>	<b>71,1</b>	<b>73,0</b>
<b>No Fermentadores</b>	51,4	62,2	<b>55,6</b>
<b>Fermentadores</b>	22,9	8,9	<b>17,4</b>
<b>Gram positivos</b>	<b>25,7</b>	<b>28,9</b>	27,0
<b>Bacilos</b>	22,9	24,4	<b>23,5</b>
<b>Cocos</b>	<b>2,8</b>	<b>4,5</b>	<b>3,5</b>

Tabla 4.- Clasificación taxonómica (% cepas).

Phylum	Clase	Manantial	Sondeo	Total
<b><i>Proteobacteria</i></b>		<b>63,0</b>	<b>67,5</b>	<b>64,7</b>
	Alpha	7,7	15,0	<b>10,5</b>
	Beta	3,0	5,0	<b>3,8</b>
	Gamma	50,8	47,5	<b>49,5</b>
	Delta	1,5	0,0	<b>0,9</b>
<b><i>Bacteroidetes</i></b>		<b>9,2</b>	0,0	5,7
	<i>Flavobacteria</i>	6,1	0,0	<b>3,8</b>
	<i>Sphingobacteria</i>	3,1	0,0	<b>1,9</b>
<b><i>Actinobacteria</i></b>	<i>Actinobacteria</i>	<b>9,2</b>	<b>7,5</b>	8,6
<b><i>Firmicutes</i></b>	<b><i>Bacilli</i></b>	18,5	25	21,0

En la Tabla 5 se detallan las especies de bacterias Gram negativas aisladas en esta agua, siendo *Pseudomonas fluorescens* la predominante. Esta bacteria, no fermentadora, tiene escasos requerimientos nutricionales y gran diversidad metabólica que le permite utilizar diversas fuentes de carbono, por lo que es capaz de sobrevivir y multiplicarse en ambientes oligotróficos como las aguas mineromedicinales, habiendo sido detectada en otros manantiales hipotermales (5,19,24) y en aguas minerales envasadas (25,28,29).

Además, se han aislado varias cepas de bacilos Gram negativos fermentadores, como *Aeromonas hydrophila*. Esta bacteria tiene su hábitat en el agua dulce y es frecuente encontrarla en aguas minerales (4,5,9,16,19). También se han detectado diversas especies de enterobacterias (*Budvicia aquatica*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia ficaria* y *S. liquefaciens*) (Tabla 5). Su presencia no indica contaminación fecal ya que forman parte de la microbiota del agua y del suelo y se han encontrado en otros manantiales mineromedicinales (4,5,9,16).

Los bacilos Gram positivos encontrados pertenecen, principalmente al género *Bacillus* (Tabla 6). Estas bacterias esporuladas, proceden del suelo y se han encontrado en manantiales minerales termales (5, 16, 17). La principal característica de *Cellulomonas* es ser celulolítico pero también hidroliza el almidón y la gelatina por lo que contribuye a la transformación de la materia orgánica. *Rhodococcus* es muy resistente a los ambientes extremos ya que posee ácidos micólicos y también se ha aislado de otros manantiales hipotermales (4, 9, 16, 19, 24). Estas bacterias tienen una gran capacidad metabólica para degradar compuestos xenobióticos, como hidrocarburos, detergentes y pesticidas por lo que son importantes en la depuración de suelos y aguas (30).

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden al género *Staphylococcus* (Tabla 6). 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 (4,9,16,19).

**Tabla 5.-** Géneros y especies de bacterias heterótrofas y oligotrofas Gram negativas (% cepas).

<b>Bacterias Gram negativas</b>	<b>Manantial N=70</b>	<b>Sondeo N=45</b>
<b>No fermentadoras</b>	<b>51,4</b>	<b>62,2</b>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2,8	2,2
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2,8	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	4,4
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1,4	6,7
<i>Cellvibrio mixtus</i>	2,8	2,2
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	5,7	-
<i>Desulfovibrio spp</i>	1,4	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	4,4
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	4,3	4,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10,0	13,3
<i>Pseudomonas luteola</i>	2,8	4,4
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1,4	2,2
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2,8	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	4,3	6,7
<i>Xanthobacter flavus</i>	1,4	-
No identificadas	7,1	11,1
<b>Fermentadoras</b>	<b>22,9</b>	<b>8,9</b>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7,1	-
<i>Budvicia aquatica</i>	-	6,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,8	2,2
<i>Serratia ficaria</i>	11,4	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	1,4	-

**Tabla 6.-** Géneros y especies de bacterias heterótrofas y oligotrofas Gram positivas (% cepas).

<b>Bacterias Gram positivas</b>	<b>Manantial N=70</b>	<b>Sondeo N=45</b>
<b>Bacilos</b>	<b>22,9</b>	<b>24,4</b>
<i>Bacillus</i> spp	8,6	13,3
<i>Bacillus firmus</i>	2,8	2,2
<i>Bacillus lentus</i>	1,4	-
<i>Brevibacillus</i> spp	1,4	2,2
<i>Brevibacterium linens</i>	4,3	-
<i>Cellulomonas</i> spp	1,4	2,2
<i>Rhodococcus luteus</i>	-	2,2
<i>Rhodococcus marinonascens</i>	2,8	-
<i>Rhodococcus ruber</i>	-	2,2
<b>Cocos</b>	<b>2,8</b>	<b>4,5</b>
<i>Staphylococcus hominis</i>	2,8	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	2,2
<i>Staphylococcus warneri</i>	-	2,2

## 2.7. Biotapetes

Se han tomado muestras de dos tipos de tapetes microbianos formados en los canales de agua que se encuentran en el jardín del Balneario. 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.

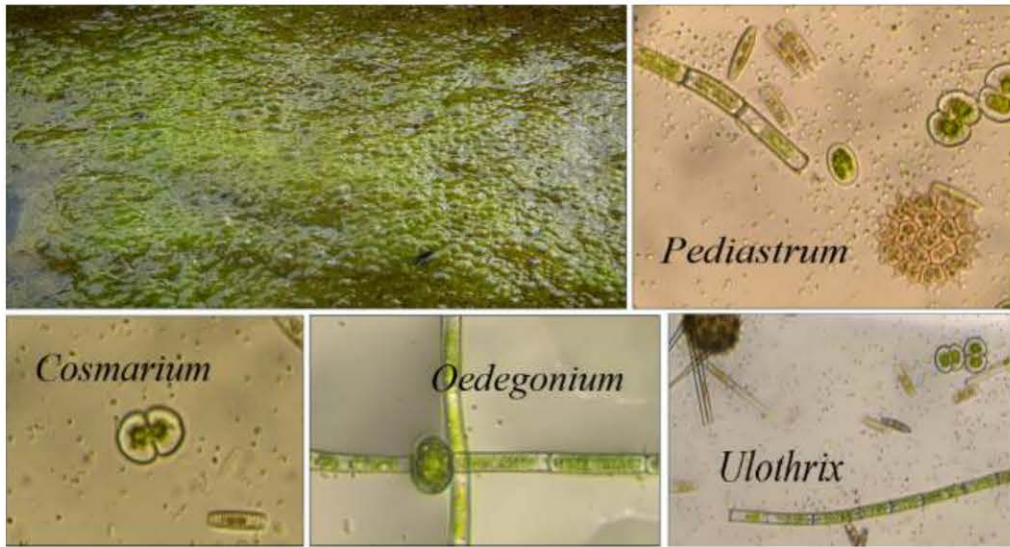
Los biotapetes están constituidos por diversas comunidades microbianas, dependiendo de las condiciones ambientales (luz, temperatura y oxígeno) y de la

composición del agua (pH y concentración de sales). Están formados por asociaciones de microorganismos procariotas y eucariotas, muchos de ellos fotosintéticos y filamentosos (cianobacterias y algas), donde se alojan otros organismos unicelulares productores de exopolímeros que unen los microorganismos, los protegen de los agentes externos y permiten la interacción entre las células. Esta asociación simbiótica tienen muchas ventajas ya que las poblaciones comparten los nutrientes, aportando diferentes enzimas que metabolizan diversos compuestos por lo que pueden vivir en ambientes desfavorables (31).

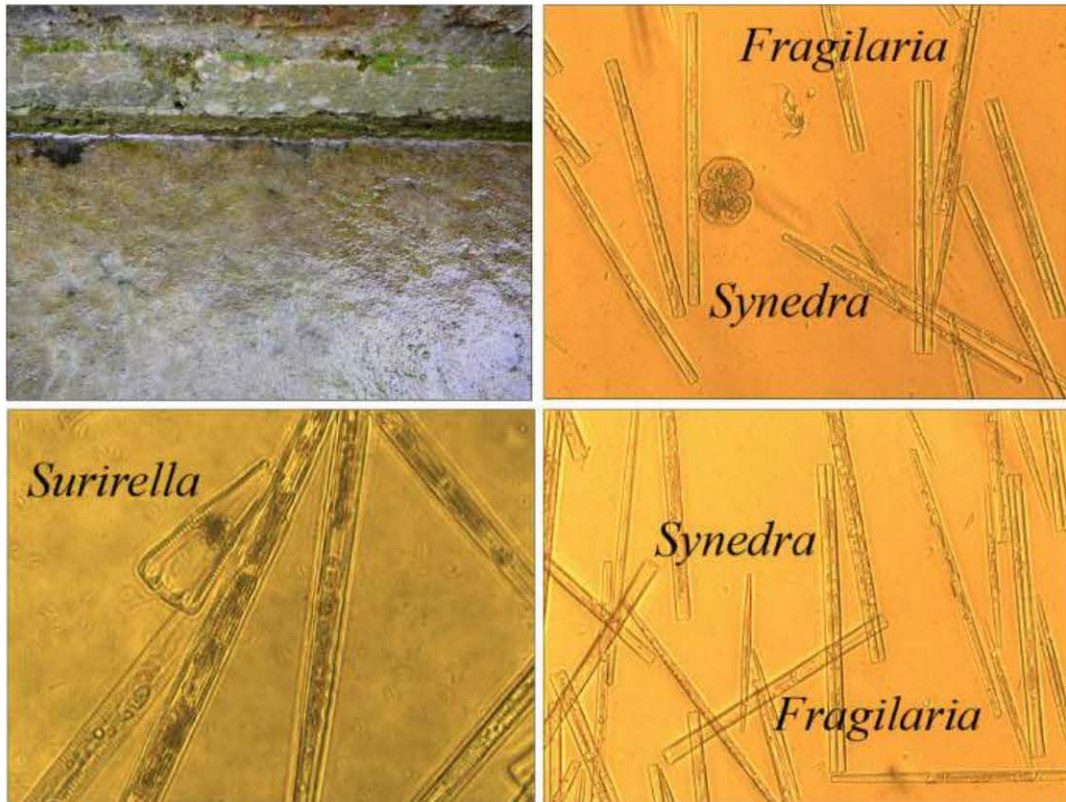
Se han estudiado dos tipos de biotapetes. Uno de ellos de color verde brillante, con abundante gas y consistencia media compuesto, principalmente, por algas verdes filamentosas (*Oedogonium crispum*, *Ulotrix subtilissima*), conjugadas (*Cosmarium*) y diatomeas (*Fragilaria*, *Navicula*, *Synedra*) y en menor proporción cianobacterias esféricas (*Synechococcus*). (Figura 5).

El otro tapete es de color marrón y aspecto gelatinoso, formado por diatomeas (*Fragilaria*, *Synedra*, *Surirella*) y en menor cantidad algas conjugadas (*Cosmarium*, *Pediastrum*) y cianobacterias filamentosas (*Lyngbya*) y esféricas (*Synechococcus*). (Figura 6).

Las comunidades microbianas que constituyen estos tapetes son semejantes a las encontradas en los que se forman en algunos manantiales hipotermales españoles (9,16,19) y manantiales termales de diferentes partes del mundo (32-34).



**Figura 5.-** Biotapete 1.



**Figura 6.-** Biotapete 2.



## CONCLUSIONES

---

En las muestras estudiadas 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 bacterias oligotróficas, predominando los bacilos Gram negativos de la Clase *Gammaproteobacteria*, lo que es habitual en los manantiales hipotermales. Se han detectado bacterias con actividad proteolítica, amilolítica, celulolítica y amonificante que intervienen en los ciclos biogeoquímicos y contribuyen a la autodepuración de las aguas.

## AGRADECIMIENTOS

---

Las autoras agradecen a los propietarios del Balneario, la familia Cortés, todas las atenciones que han tenido con ellas durante su estancia en el establecimiento, así como las facilidades dadas para la toma de muestras. Además queremos agradecer la ayuda en la preparación del material de laboratorio y los medios de cultivo a D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Elena Argüelles Rojo, técnico de laboratorio

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de la Gobernación (1926) Real Decreto 8-7-1926. Gaceta de Madrid N<sup>o</sup> 191: 226.
2. Maraver, F. & Armijo, F. (2010) Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. Ed. Complutense. Madrid.
3. Boulos, L.; Prévost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J. & 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Leclerc, H. & Moreau, A. (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 207-222.
9. 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.
10. Oliver, J.D. (2005) The viable nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93-100.

11. 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.
12. Anónimo (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington.
13. Anónimo (1998) Water quality. Detection and enumeration of Legionella. International Standard ISO 11731.
14. Pochon, J. & Tardieux, P. (1956) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle. St. Mandé (Seine).
15. Rodina, A.G. (1972) Methods in aquatic microbiology. University Park Press. Baltimore.
16. Mosso, M.A. & De la Rosa, M.C. (2011) Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción. An. R. Acad. Nac. Farm. 77:57-73.
17. 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.
18. Anónimo (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 14<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington.
19. 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.
20. De Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene, J & Figueras, M.J. (2000) Atlas of Clinical Fungi. Second Ed. Vol 1. Central Bureau von Schimmelcultures. Utrech, Netherland.
21. Stanier, R.; Adelberg, E. & Ingraham, J. (1984) Microbiología. Reverté. Barcelona.

22. 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.
23. Whitman, W. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. III. The Firmicutes. Springer. New York.
24. 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.
25. Loy, A.; Beiser, W. & Meier, H. (2005) Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3624-3632.
26. Lee, J. Shin, Y. Yoon, J., Takeuchi, M., Pyum, 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.
27. Maddula, V.; Pierson, E. & Pierson, L. (2008) Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strains 30-84: Effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *J. Bacteriol.* 190: 2759-2766.
28. 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.
29. Leclerc, H. & Da Costa. M. (2004) *Microbiology of natural mineral waters*. In: *Technology of Bottled water*. 2<sup>a</sup> Ed. Blacwell Publishing. Boston.
30. Williams, S.; Sharpe, M.E. & Holt, J. (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 4. Williams. & Wilkins. Baltimore. USA.
31. Zamora, A.; de la Rosa, M.C.; Mosso, M.A.; Guijarro, J.F & Rodriguez, C. (2009) *Biofilmes, escenarios de biodiversidad*. San. Mil. 65:246-25
32. 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.

33. 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.
34. Becraft, E.; Cohan, F.; Khul, M.; Jensen, S. & Ward, D. (2011) Fine-scale distribution patterns of *Synechococcus* ecological diversity in microbial mats of Mushroom spring, Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 7689-7697.