

ESTUDIO 4

Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Villavieja

Title in English: *Microbiology of the natural mineral water of Villavieja Spa*

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

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

An. Real. Acad. Farm. Vol 82, Special Issue (2016) pp. 75-86.

RESUMEN	ABSTRACT
<p>Se ha estudiado la microbiota autóctona y alóctona del agua mineromedicinal del Balneario de Villavieja (Castellón). El número total de microorganismos en el agua ha sido de $4,7 \times 10^4$/mL y el número de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas de 103 ufc/mL. No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos en 250 mL de agua. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacilos Gram negativos no fermentadores del Phylum Proteobacteria (64,4%) y, en menor proporción, por bacilos Gram positivos (24,4 %) y cocos Gram positivos (6,7 %). Las especies más frecuentes han sido <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (15,5 %) y <i>Leifsonia aquatica</i> (13,3 %). Se han detectado bacterias con actividades amonificantes, proteolíticas, amilolíticas y sulfato-reductoras en 100 mL de agua que contribuyen a la autodepuración del agua</p>	<p>The autochthonous and alochthonous microbiota of the natural mineral water of Villavieja Spa have been studied. The total number of microorganisms in the water was of 4.7×10^4/mL and the number of heterotrophic and oligotrophic viable bacteria was 10^3 cfu/mL. Neither faecal indicators nor pathogenic microorganisms were found in 250 mL of water. The autochthonous microbiota mostly belongs to Gram-negative bacilli, from the <i>Phylum Proteobacteria</i> (64.4%) and in smaller percentage to the Gram-positive bacilli (24.4%) and cocci (6.7%). The most frequently found species were <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (15.5%) and <i>Leifsonia aquatica</i> (13.3%). Moreover ammonifying, proteolytic, amylolytic and sulphato-reduced bacteria have been detected in 100 mL of water, all of them involved in self-purification process of water.</p>
<p>Palabras clave: Manantial hipertermal; Microbiota autóctona; Biodiversidad; Agua mineromedicinal.</p>	<p>Keywords: Hyper thermal spring; Autochthonous microbiota; Biodiversity; Mineral water.</p>

1. INTRODUCCIÓN

El Balneario de Villavieja se encuentra situado en el municipio del mismo nombre, también llamado La Vila Vella, en la comarca de la Plana Baja, en la zona suroriental de la provincia de Castellón, perteneciente a la Comunidad Valenciana. El término municipal se encuentra en las estribaciones de la Sierra del Espadán y muy cerca de la Costa de Azahar del mar Mediterráneo (Figura 1).



Figura 1. Municipio de Villavieja: rotonda de entrada, vista general.

Las propiedades curativas de las aguas de esta localidad ya eran conocidas por los romanos, pero fue a finales del siglo XVII cuando se construyeron las primeras casetas de baños y en el siglo XIX se mencionan hasta once balnearios. El Balneario actual, situado en el centro de la población, fue reconstruido después de la Guerra Civil sobre el antiguo Balneario de Monlleó y ampliado con varias construcciones vecinas, constituyendo la Agrupación de Balnearios de Villavieja (1) (Figura 2).



Figura 2. Edificio del balneario de Villavieja.

El objetivo principal de este trabajo ha sido determinar los microorganismos que pueden 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 por el agua. Además, por primera vez, se ha estudiado la microbiota autóctona de estas aguas mineromedicinales, no solo para

conocer su número, identidad y diversidad sino también su actividad metabólica que tanta importancia tiene en la autodepuración de las mismas.

2. RESULTADOS

2.1. Muestras

Estas aguas mineromedicinales emergen a una temperatura de 39º C, tienen un pH neutro y se clasifican como híper termales, de mineralización media, sulfatadas cálcicas magnésicas, radiactivas y extremadamente duras (2).

El Balneario utiliza el agua mineromedicinal procedente de un pozo que se encuentra en el interior del edificio, en una pequeña habitación en la entrada del mismo (Figura 3). El agua se capta con una bomba y se conduce por tuberías a las instalaciones del balneario para su uso en los distintos tratamientos.

Para realizar este estudio se tomaron muestras de agua en el pozo, en junio del año 2014. 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.



Figura 3. Punto de emergencia: entrada, pozo.

2.2. Microorganismos totales y vivos

El número de todos los microorganismos presentes en el agua se ha realizado por el método del recuento directo, utilizando varios fluorocromos: naranja de acridina, Syto® 9 y yoduro de propidio (BacLight Live/Dead) que nos permite distinguir los microorganismos muertos de los vivos. Las muestras teñidas se filtraron por una membrana Nucleopore de 0,2 µm de diámetro de poro y se observaron y contaron con un microscopio de fluorescencia y objetivo de inmersión.

El número de microorganismos totales ha sido de $4,7 \times 10^4$ / mL y el porcentaje de vivos, 72,2 %. Estos resultados son semejantes a los encontrados en otros

manantiales de aguas mineromedicinales extremadamente duras (3, 4), siendo menor el porcentaje de microorganismos vivos.

2.3. Bacterias aerobias viables

La determinación del número de bacterias aerobias viables en las aguas mineromedicinales es útil pues permite conocer si el agua ha sido tratada con algún proceso de desinfección o si ha habido contaminación del acuífero. Diversos autores han estudiado las condiciones de cultivo más adecuadas para detectar el mayor número de bacterias presentes en este tipo de aguas, concluyendo que hay que utilizar medios de cultivo con diferentes nutrientes, períodos de incubación largos y varias temperaturas (5, 6). En este trabajo se han determinado las bacterias heterótrofas, utilizando el medio agar extracto de levadura (7) y las bacterias oligotrofas empleando agar R₂A (5). El recuento de estas bacterias se realizó por las técnicas de filtración con filtros Millipore de 0,22 µm y dilución en placa, e incubando a 22 °C, cinco días, a 37 °C, 48 horas y a 45 °C, 24 horas. Los resultados se han expresado en unidades formadoras de colonias por mL de agua (ufc/mL).

El número de bacterias viables ha sido elevado, tanto en las incubadas a 22 °C como a 37 °C, con una media de 10³ ufc/mL (Tabla 1), presentando más bacterias oligotrofas que heterótrofas, propio de aguas subterráneas pobres en materia orgánica (6). Se ha observado una relación con la temperatura de emergencia del agua, 39 °C, ya que aunque el número de bacterias viables incubadas a 37 °C ha sido mayor que las incubadas a 22 °C, no significa que el acuífero esté contaminado con bacterias patógenas. Además, el número de bacterias termófilas, incubadas a 45 °C, ha sido menor que el de mesófilas lo que indica que la microbiota de estas aguas está constituida por bacterias mesófilas que se han adaptado a las condiciones de temperatura del manantial. Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles híper termales (8, 9, 10).

En este estudio hemos obtenido que las bacterias cultivables son diez veces menores que los microorganismos vivos, observados con microscopio de fluorescencia, lo que coincide con los resultados de Leclerc y da Costa en diversas aguas minerales (11). Esta diferencia se debe a que muchas de las bacterias presentes se encuentran en el estado de viable no cultivable y no crecen en las condiciones y medios de cultivo utilizados en el laboratorio (12).

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

T ^a	Bacterias	Manantial
22 °C	Heterótrofas	1,6 x10 ³
37 °C		2,4 x10 ³
45 °C		7,2 x10
22 °C	Oligotrofas	6,7 x10 ³
37 °C		7,3 x10 ³
45 °C		1,5 x10 ²

2.4. Microorganismos de interés sanitario

Las aguas mineromedicinales se utilizan en los balnearios con fines terapéuticos, por lo que deben tener ausencia de bacterias que indiquen contaminación fecal y de microorganismos patógenos que puedan transmitirse a través del agua por vía oral, tópica o inhalatoria.

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*, además se ha investigado la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando los métodos oficiales españoles de las aguas de consumo humano (7) y de bebida envasadas (13). También se ha estudiado la presencia de *Staphylococcus aureus*, filtrando 250 mL de agua, cultivando el filtro en caldo triptona soja y aislando en agar Baird-Parker y de *Legionella pneumophila*, según la Norma ISO 11731 (14).

No se han encontrado ninguno de los microorganismos indicadores de contaminación fecal, ni bacterias patógenas (*E. coli*, *Salmonella*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *L. pneumophila*) en 250 mL de agua.

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 y mantiene el equilibrio biológico de estos ambientes hidrotermales (6).

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 en otro trabajo (15), incubando a 30 °C durante 30 días. Los resultados se han expresado como NMP de microorganismos en 100 mL de agua (Tabla 2).

Tabla 2. Número de microorganismos de interés ecológico (NMP/100 mL).

Microorganismos	Manantial
Proteolíticos	>2,4 x10 ⁴
Amilolíticos	>2,4 x10 ⁴
Celulolíticos	<3
Amonificantes	>2,4 x10 ⁴
Nitrificantes	<3
Sulfato reductores	4,3 x10

El agua del manantial ha presentado bacterias proteolíticas, amilolíticas y amonificantes. Las bacterias proteolíticas detectadas hidrolizan la gelatina y se han identificado como *Stenotrophomonas maltophilia* y *Leifsonia aquatica*. Las bacterias amilolíticas que hidrolizan el almidón son de los géneros *Bacillus* y *Leifsonia*. En cuanto a las bacterias amonificantes que producen amoniaco de la asparragina pertenecen, principalmente, al género *Arthrobacter*.

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, siendo frecuente su presencia en manantiales de diferente composición química tanto hipertermales (8, 9, 10) como hipotermas (3, 15, 16, 17, 18).

Además se han encontrado bacterias sulfato reductoras del género *Desulfovibrio* que intervienen en el ciclo del azufre, que podrían convertir los sulfatos presentes en estas aguas en sulfuros, en ausencia de oxígeno. Estas bacterias también se han detectado en otros manantiales mineromedicinales sulfatados (16,19).

Se han estudiado los microorganismos halófilos moderados, utilizando agar halófilo con 15 % de cloruro sódico e incubando a 30° C, durante 7 días, pero no se han detectado debido, probablemente, a que tienen una cantidad muy baja de cloruros y sodio.

También se han estudiado otros tipos de microorganismos: hongos, cianobacterias y algas. El recuento de hongos se realizó por el método de filtración, utilizando el medio agar Sabouraud con cloranfenicol al 0,05 %. Se han encontrado un número bajo de hongos 11 por 100 mL que pertenecen a levaduras y hongos

filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Alternaria*. La presencia de hongos en aguas minerales es poco frecuente pero se han detectado en otros manantiales mineromedicinales en pequeño número (3, 4, 15, 16).

No se han detectado cianobacterias ni algas en ninguna muestra de agua.

2.6. Identificación de bacterias heterótrofas

Las cepas aisladas en los distintos medios de recuento se han identificado por varias características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas en un trabajo anterior (20). Además se utilizó el sistema de identificación miniaturizado API® (bioMérieux), empleando las galerías: 20 NE para los bacilos Gram negativos no fermentadores, Staph para los cocos Gram positivos y Coryne para los bacilos Gram positivos irregulares.

En las muestras estudiadas se han aislado 45 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (68,8 %), bacilos Gram positivos (24,4 %) y cocos Gram positivos (6,7 %) (Figura 4). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (21) las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al *Phylum Proteobacteria* (64,4 %), y en menor proporción a los *Phyla: Actinobacteria* (17,9 %), *Firmicutes* (13,3 %) y *Bacteroidetes* (4,4 %) (Figura 4).

En estas aguas la mayoría de las cepas aisladas son bacilos Gram negativos no fermentadores de la clase *Gammaproteobacteria* (48,8%) pero también se ha detectado una gran proporción de bacterias Gram positivas lo que coincide con lo encontrado en otros manantiales minerales extremadamente duros tanto hipertermales (8, 9, 10) como hipotermas (3, 4, 15).

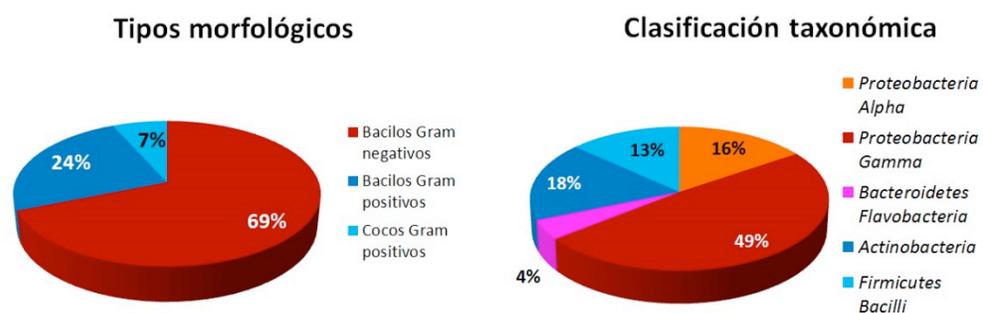


Figura 4. Clasificación morfológica y taxonómica (% cepas).

En la Tabla 3 se detallan los géneros y especies de bacterias aisladas en este manantial.

Tabla 3. Géneros y especies de bacterias (n^o y % de cepas).

Bacterias		Manantial (n= 45)	
Phylum	Géneros-Especies	(n^o)	(%)
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium gleum</i>	2	4,4
Proteobacteria	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	5	11,1
Alpha	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	4,4
Gamma	<i>Acinetobacter junii</i>	1	2,2
	<i>Photobacterium damsela</i>	2	4,4
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2	4,4
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2	4,4
	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	7	15,5
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	11,1
	No identificados	3	6,6
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	2	4,4
	<i>Leifsonia aquatica</i>	6	13,3
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	3	6,6
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	2,2
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	2	4,4

El género más aislado ha sido *Pseudomonas*, habitual en aguas minerales (11, 20), además se han encontrado cepas de *Stenotrophomonas* y *Sphingomonas*. Ambos géneros están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden considerarse autóctonos de aguas minerales (22, 23).

Entre los bacilos Gram negativos, la especie más frecuente ha sido *Pseudomonas pseudoalcaligenes* que ha sido encontrada en ambientes naturales. Esta especie se caracteriza porque utiliza muy pocos compuestos orgánicos y puede crecer a 42 °C (23) por lo que las cepas aisladas en este manantial pueden vivir a la temperatura de emergencia del mismo. Las otras especies de *Proteobacteria*, presentes en este manantial, son frecuentes en aguas minerales y han sido detectadas en otros manantiales mineromedicinales (3, 4, 15, 17, 18). También se han aislado dos cepas del género *Chryseobacterium* perteneciente al *Phylum Bacteroidetes*. Este género, propuesto para incluir a diversas especies de *Flavobacterium*, está siendo muy estudiado en los últimos años, describiéndose nuevas especies aisladas de ambientes muy variados que presentan actividades metabólicas con aplicaciones industriales y medioambientales ya que pueden degradar herbicidas, insecticidas y otros compuestos químicos. Las cepas aisladas en este manantial se han identificado como

Chryseobacterium gleum, especie ubicua que vive en el agua y el suelo y es capaz de crecer a 42 °C (24).

Los bacilos Gram positivos detectados son, en su mayoría, de morfología irregular y pertenecen a los géneros *Arthrobacter* y *Leifsonia*, así mismo se ha encontrado un pequeño número de cepas de bacilos esporulados del género *Bacillus*. *Arthrobacter* y *Bacillus* proceden del suelo, pero son frecuentes en manantiales termales (9, 19, 20). *Leifsonia aquatica* (antes *Corynebacterium aquaticum*) vive en el agua y se ha aislado en otros manantiales mineromedicinales (3, 4, 16, 17).

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden a los géneros *Staphylococcus* y *Vagococcus*. Los estafilococos son muy ubicuos y se han detectado en muchas aguas mineromedicinales (3, 4, 15, 16, 17, 18, 20). Además se ha aislado *V. fluvialis* cuyo hábitat es el agua dulce y que también hemos encontrado en otros manantiales minerales (18, 25).

En este manantial se han aislado varias cepas de bacterias pigmentadas lo que es frecuente en aguas minerales (15,16, 18), debido a que los pigmentos las protegen de las radiaciones evitando la muerte fotodinámica. Entre ellas, destacamos las especies de bacilos Gram negativos: *Brevundimonas vesicularis*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Chryseobacterium gleum* y de bacilos Gram positivos *Leifsonia aquatica*, todas ellas con pigmentos amarillos (Figura 5).

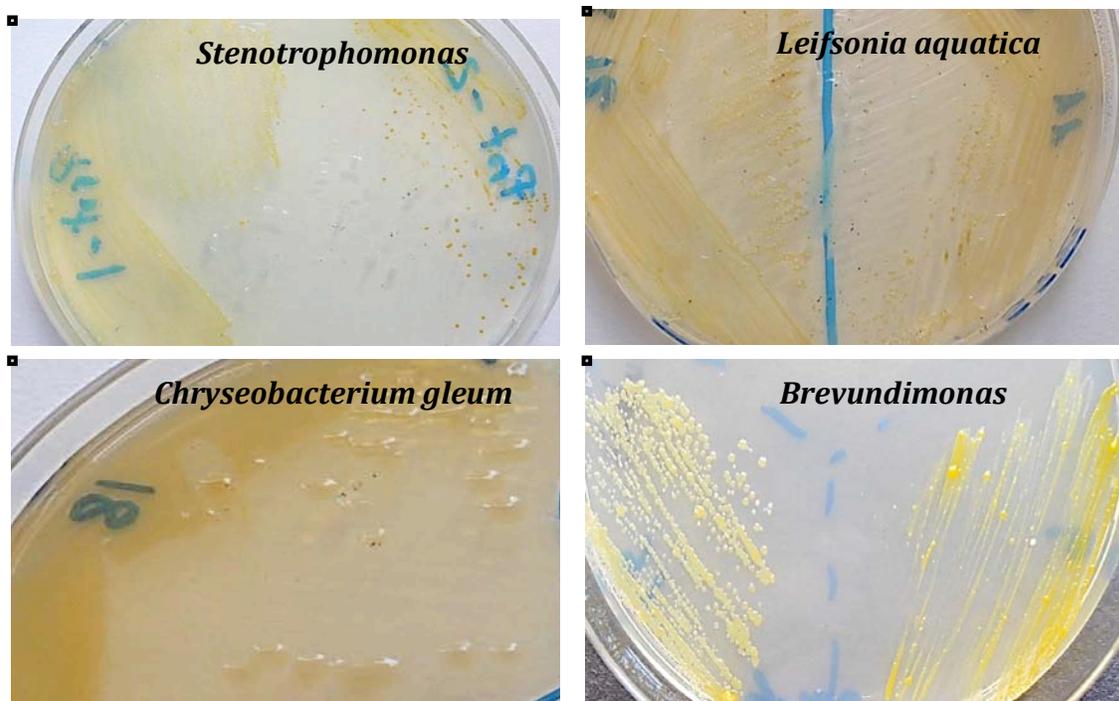


Figura 5. Bacterias pigmentadas

3. 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*, además presenta bacterias Gram positivas lo que es habitual en los manantiales hipertermales. 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 propietarios del Balneario y en especial a D. Vicente Caballer Almela, las facilidades dadas para la toma de muestras. Además, queremos agradecer a D^a M^a Elena Argüelles Rojo, técnico de laboratorio, su valiosa ayuda en la preparación del material de laboratorio y los medios de cultivo.

5. REFERENCIAS

1. Sánchez Ferre J. Guía de establecimientos balnearios de España. Madrid: Ministerio de obras públicas y transporte, 1992.
2. Maraver F, Armijo F. Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. Madrid: Ed. Complutense, 2010.
3. De la Rosa MC, Andueza F, Sánchez MC, Rodríguez C, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. An R Acad Nac Farm 2004; 70: 521-42.
4. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C, Mosso MA. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. An R Acad Nac Farm 2009; 75: 763-80.
5. Reasoner DJ, Geldreich E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environ Microbiol 1985; 49: 1-7.
6. Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 207-22.
7. Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero sobre Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 45: 7228-45.
8. De la Rosa MC, Mosso MA, Vivar MC, Medina MR, Arroyo G, Díaz F. Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario de La Toja. In:

- Balneario de La Toja (Monografías de Aguas Minero Medicinales 19). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 1993; pp.45-58.
9. Mosso MA, De la Rosa MC, Vivar MC, Arroyo G, Díaz F. Microbiología de las aguas mineromedicinales del manantial del Balneario de Lugo. In: Balneario de Lugo (Monografías de Aguas Minero Medicinales 20). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 1994: 43-52.
 10. De la Rosa MC, Mosso MA, Díaz F, Vivar MC, Medina MR. Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales de Fitero. In: Balneario de Fitero (Monografías de Aguas Minero Medicinales 18). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 1991; pp.45-60.
 11. Leclerc H, Da Costa M. Microbiology of natural mineral waters. In: Technology of Bottled water. 2nd ed. Boston: Blacwell Publishing, 2004.
 12. Oliver JD. The viable nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005; 43: 93-100.
 13. 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. Water quality. Detection and enumeration of *Legionella*. International Standard ISO 11731, 1998.
 15. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario El Raposo. An R Acad Nac Farm 2013; 80, 5: 74-95.
 16. Mosso MA, Sánchez MC, Rodríguez C, De la Rosa MC. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. An R Acad Nac Farm 2006; 72: 285-304.
 17. Mosso MA, De la Rosa MC. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción. An R Acad Nac Farm 2011; 77: 57-73.
 18. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C. Microbiología del agua mineral del Balneario Villa de Olmedo. An R Acad Nac Farm 2015 En prensa.
 19. Mosso MA, Sánchez MC, De la Rosa MC. Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada. An R Acad Nac Farm 2002; 68: 381-405.

20. Mosso MA, De la Rosa MC, Vivar, MC, Medina MR. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of termal springs in Spain. *J Appl Bacteriol* 1994; 77: 370-381.
21. Garrity G. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol. I. New York: Springer, 2001.
22. Casanovas-Massana A, Blanch A. Diversity of the heterotrophic microbial population for distinguishing natural waters. *Int J of Food Microbiol* 2012; 153: 38-44.
23. Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol. II: The *Proteobacteria*. New York: Springer, 2005.
24. Whitman WB. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol. IV: The *Bacteroidetes*. New York: Springer, 2011.
25. De la Rosa MC, Mosso MA, Prieto MP. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario "El Paraíso" de Manzanera (Teruel). *An R Acad Nac Farm* 2001; 67: 173-83.