ESTUDIO 4

Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de San Nicolás

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

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

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

An. Real. Acad. Farm. Vol 83, Special Issue (2017) pp. 63-78.

RESUMEN

Se han estudiado los microorganismos autóctonos y alóctonos de las aguas mineromedicinales del Balneario San Nicolás (Alhama de Almería). No se han encontrado bacterias patógenas ni indicadores fecales en 250 mL de agua. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacterias oligotrofas Gram positivas de la clase *Firmicutes*. El sondeo Sillero, utilizado en los tratamientos, presenta un número muy bajo de bacterias viables (<10 ufc/mL) que corresponden en su mayoría a cocos Gram positivos (93,3%) y a la especie *Staphylococcus lugdunensis* (40%). El sondeo San Marcos tiene una mayor diversidad microbiana, predominando los bacilos Gram positivos de la especie *Bacillus licheniformis* (32,4%) y los bacilos Gram negativos de la especie *Cupriavidus pauculus* (16,2%). En todas las muestras se han detectado microorganismos proteolíticos, amilolíticos, nitrificantes y amonificantes, así como bacterias halófilas y del hierro. También se han estudiado los biotapetes formados en las fuentes utilizadas para bebida, constituidos por una asociación de cianobacterias filamentosas y esféricas, así como del alga *Cosmarium.*

Palabras clave: Manantial hipertermal; Microbiota autóctona; Biodiversidad; Biotapetes.

ABSTRACT

Both the autochthonous and the allochthonous microorganisms of minero-medicinal water from the San Nicolas spa (Alhama of Almería, Spain) have been analyzed. No pathogen bacteria or faecal indicators have been found in 250 mL of water. The autochthonous microbiota is mainly composed of oligotrophic Gram-positive bacteria of the *Firmicutes* phylum. The Sillero sampling, used in the spa treatments, presents a very low count of viable bacteria (< 10 cfu / mL), being the most part of them Gram-positive cocci (93.3%) of the *Staphylococcus lugdunensis* (40%) species. The San Marcos sampling presents a higher microbial diversity, predominantly Gram-positive bacilli of the *Bacillus licheniformis* (32.4%) species and Gram-negative bacilli of the *Cupriavidus pauculus* (16.2%) species. Proteolytic, amylolitic, nitrifying and ammonifying microorganisms have been detected in all samples, altogether with halophilic and iron bacteria. An analysis of the microbial mats growing in the spa drinking water sources shows that these consist of an association of spherical and filamentous cyanobacteria and the *Cosmarium* algae.

Keywords: Hyperthermal spring; Autochthonous microbiota; Biodiversity; Microbial mats.

1. INTRODUCCIÓN

El Balneario de San Nicolás se encuentra situado en el municipio de Alhama de Almería, en la zona sur de la provincia de Almería, perteneciente a la Comunidad Autónoma de Andalucía. El término municipal se encuentra en las estribaciones de la Sierra de Gádor y el valle del río Andarax en la comarca de la Alpujarra almeriense. (Figura 1).

Figura 1. Municipio de Alhama de Almería: entrada, vista general.

Las propiedades curativas de las aguas de esta localidad ya eran conocidas por los romanos y árabes que le dieron el nombre de Alhama, pero fue a finales del siglo XVI cuando se construyeron las primeras casetas de baños. En 1522, debido a un terremoto, se secó el manantial y en el siglo XIX se construyó el primer Balneario que se inauguró en 1877, declarándose ese año sus aguas de utilidad pública (1). En 1885, un nuevo terremoto aumentó el caudal y la temperatura del manantial, no afectando a las instalaciones balnearias que tuvieron continuas mejoras. Los años 20 y 30 del siglo XX fueron la época de esplendor del Balneario en la que se confirma su utilidad pública (2). Durante la Guerra Civil se destruyen las instalaciones del balneario y en 1952 resurge un nuevo edificio. El Balneario actual, que ocupa una manzana en el centro de la población, ha sido objeto de numerosas reformas desde los años 80, convirtiéndose en un lugar de referencia de la provincia (Figura 2).

El objetivo principal de este trabajo ha sido determinar los microorganismos indicadores de contaminación fecal y algunos patógenos que se trasmiten por el agua que pueden suponer un riesgo para la salud de los usuarios que reciben los tratamientos terapéuticos en el Balneario. Además, por primera vez, se ha estudiado la microbiota autóctona de estas aguas mineromedicinales, con el fin de conocer su número, identidad y diversidad, así como su actividad metabólica, de gran importancia en la autodepuración de las mismas.

Figura 2. Edificio del balneario de San Nicolás.

2. RESULTADOS

2.1. Muestras

Estas aguas mineromedicinales emergen a una temperatura de 47,5 ºC, tienen un pH neutro y se clasifican como hipertermales, de mineralización media, bicarbonatadas, sulfatadas, cálcicas, magnésicas y extremadamente duras (3).

El Balneario utiliza el agua mineromedicinal procedente del sondeo Sillero, que se encuentra a unos 300 metros de distancia del edificio balneario en la calle Nicolás Salmerón. Se accede por una puerta en forma de arco de herradura, bajando unas empinadas escaleras y atravesando unas angostas galerías (Figura 3). A unos 100 metros de éste se encuentra el sondeo San Marcos que se utiliza en caso necesario. El agua se capta con unas bombas y se conduce por tuberías a las instalaciones del Balneario para su uso en los distintos tratamientos.

Para realizar este estudio, se tomaron muestras, en octubre del año 2015, del agua de los dos sondeos y de las fuentes que se encuentran en el patio del Balneario y que se utilizan en bebida por los agüistas (Figura 4). También se tomaron muestras de los tapetes microbianos formados en dichas fuentes.

Figura 3. Punto de emergencia: entrada, pozo.

Figura 4. Fuente.

Las muestras de agua 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. Una muestra de agua y otra de biotapetes se fijaron con formol al 4% para su posterior estudio.

2.2. Microorganismos totales y vivos

La determinación del número de todos los microorganismos presentes en el agua se ha realizado por el método del recuento directo, utilizando naranja de acridina. Las muestras teñidas se filtraron por una membrana Nucleopore de 0,2 µm de diámetro de poro y se observaron y contaron las células verdes y rojas con un microscopio de fluorescencia y objetivo de inmersión (Nikon).

El número de microorganismos totales en los sondeos Sillero y San Marcos ha sido de 6,9 x 10^3 y 5,1 x 10^4 por mL y el porcentaje de vivos 30 y 52,2%, respectivamente. Estos resultados son menores a los encontrados en otros manantiales de aguas mineromedicinales extremadamente duras (4, 5, 6). Los recuentos obtenidos por esta técnica suelen ser de cien a mil veces mayores que los obtenidos por los métodos de cultivo debido a que se contabilizan todos los microorganismos presentes, incluso los muertos o sin actividad metabólica..

2.3. Bacterias aerobias viables

La determinación del número de bacterias aerobias viables se ha utilizado desde finales del siglo XIX, como indicador de la calidad del agua de bebida. En las aguas mineromedicinales, este recuento, permite conocer si el agua ha sido tratada con algún proceso de desinfección o si ha habido contaminación del acuífero. Para detectar el mayor número de estas bacterias, presentes en este tipo de aguas, hay que utilizar medios de cultivo con diferentes nutrientes, períodos de incubación largos y varias temperaturas (7, 8). En este trabajo se han determinado las bacterias heterótrofas, utilizando el medio agar extracto de levadura (9) y las bacterias oligotrofas, empleando agar R_2A (7). 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 22º C, cinco días, a 37 ºC, 48 horas y a 45 ºC, 24 horas. Los resultados se han expresado en unidades formadoras de colonias por mL de agua (ufc/mL). (Tabla 1).

El número de bacterias viables ha sido bajo, <10 en el sondeo Sillero y <100 ufc/mL en el San Marcos, lo que indica que los puntos de emergencia están bien protegidos. Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales extremadamente duros (4, 5). El número de bacterias termófilas, incubadas a 45 ºC, 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 elevadas temperaturas del agua. Además, presentan más bacterias oligotrofas que heterótrofas, propio de aguas subterráneas donde predominan las bacterias que viven con poca materia orgánica (8).

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

BACTERIAS	T ª (ºC)	MUESTRAS		
		SILLERO	SAN MARCOS	FUENTE
Heterótrofas	22	2	19	81
	37	5	6	52
	45	0	5	0
Oligotrofas	22	2	47	-
	37	4	67	-
	45	0	27	-

En este estudio hemos obtenido que las bacterias cultivables son cien veces menores que los microorganismos vivos, observados con microscopio de fluorescencia, lo que 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 (10).

2.4. Microorganismos de interés sanitario

Las aguas mineromedicinales que se utilizan en los balnearios con fines terapéuticos, 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, en los dos sondeos y en el agua de bebida de la fuente, 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 (9) y de bebida envasadas (11). También se ha estudiado la presencia de *Staphylococcus aureus,* filtrando 250 mL de agua, cultivando el filtro en caldo triptona soja a 37 ºC y aislando en agar Baird-Parker y de *Legionella pneumophila*, según la Norma ISO 11731 (12).

Ninguna muestra ha presentado 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, debido a su gran variedad metabólica, participa en los procesos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre. Estos microorganismos transforman los compuestos orgánicos en inorgánicos, lo que contribuye a la autodepuración de las

aguas de posibles contaminantes orgánicos y mantiene 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 en otro trabajo (13), 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.

MICROORGANISMOS	MUESTRA	
NMP/100mL	**SILLERO**	**SAN MARCOS**
Proteolíticos	4,3x10	$4,6x10^2$
Amilolíticos	1,1x10	$2,4x10^2$
Celulolíticos	<3	<3
Nitrificantes	$>2,4x10^3$	$2,9x10^2$
Amonificantes	$4,6x10^2$	$>2,44x10^4$
Sulfato-reductores	<3	4,3x10
UFC/100mL		
Halófilos	14	15
Hongos	4	7

El agua de los dos sondeos ha presentado bacterias proteolíticas, amilolíticas, nitrificantes y amonificantes. Las bacterias proteolíticas detectadas hidrolizan la gelatina y se han identificado como *Rothia terrea* y *Bacillus licheniformis.* Las bacterias amilolíticas que hidrolizan el almidón son *Brevibacillus levickii* y *B.licheniformis*. En cuanto a las bacterias amonificantes que producen amoniaco de la asparragina, pertenecen a las especies *Rothia terrea* y *Cupriavidus pauculus* y las nitrificantes que oxidan el amoniaco a nitrato, son *C. pauculus .*

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 (4, 6, 14, 15) como hipotermales (13, 16, 17, 18). Las bacterias nitrificantes son abundantes en el suelo pero también se han encontrado en algunas aguas mineromedicinales en un número pequeño (13, 15, 17, 18). Suelen ser quimiolitotrofas, aunque también se han encontrado cepas de bacterias heterótrofas y en concreto, de la especie *C. pauculus*, aislada en estas aguas, que tienen la capacidad de oxidar compuestos nitrogenados, lo que, unido a su resistencia a metales pesados, podría ser utilizada en la bioremediación de ambientes contaminados (19).

En el sondeo San Marcos se han encontrado bacterias sulfato reductoras del género *Desulfovibrio* que intervienen en el ciclo del azufre y que podrían convertir

los sulfatos presentes en estas aguas en sulfuros, en ausencia de oxígeno. Estas bacterias son poco frecuentes en aguas pero se han detectado en otros manantiales mineromedicinales sulfatados (5, 6, 16, 17).

Debido a que estas aguas contienen hierro, se estudiaron las bacterias que oxidan este metal en el medio Duchon Miller (20), filtrando 100 mL e incubando a 30 ºC, 15 días. En los dos sondeos se ha observado la presencia de estas bacterias que podrían producir depósitos de hidróxido férrico y obstruir las canalizaciones. Estas bacterias también se han encontrado en los manantiales mineromedicinales ferruginosos de Caldas de Bohí (21).

Se han estudiado los microorganismos halófilos moderados, utilizando agar halófilo con 15 % de cloruro sódico e incubando a 30 °C, durante 7 días. En los dos sondeos se ha detectado un número pequeño (< 20 ufc/ 100mL) de bacterias halófilas facultativas que corresponden a *Staphylococcus lugdunensis*, en el sondeo Sillero y a *Bacillus licheniformis,* en el San Marcos. Estas bacterias propias de ambientes salinos también se han encontrado en otros manantiales de mineralización media (4, 13, 15, 17).

Además, se han estudiado otros tipos de microorganismos constituyentes de la microbiota autóctona de estas aguas: cianobacterias, algas y hongos. 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 %. Se ha encontrado un número bajo de hongos (< 10 por 100 mL) que corresponden a levaduras y hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus, Cladosporium* y *Penicillium*. Estos hongos proceden del suelo pero se adaptan a las condiciones de los ambientes acuáticos. Su presencia en aguas mineromedicinales es frecuente, aunque en pequeño número (4, 5, 6, 13, 15, 16).

2.6. Identificación de bacterias cultivables

Las cepas aisladas en los distintos medios de recuento se han identificado por varias características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas en un trabajo anterior (22). 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, Coryne para los bacilos Gram positivos no esporulados y 50CH para los esporulados.

En las muestras de los dos sondeos se han aislado 52 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (34,6%), bacilos Gram positivos (36,5%) y cocos Gram

positivos (28,8%). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (23), las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al *Phylum Firmicutes* (55,7%) y *Proteobacteria* (34,6%) y en menor proporción al *Phylum: Actinobacteria* (9,6%). En estas aguas se ha detectado una gran proporción de bacterias Gram positivas del *Phylum Firmicutes,* lo que coincide con lo encontrado en otros manantiales minerales extremadamente duros (5, 16, 24, 25). Los resultados obtenidos en cada sondeo se exponen en la figura 5.

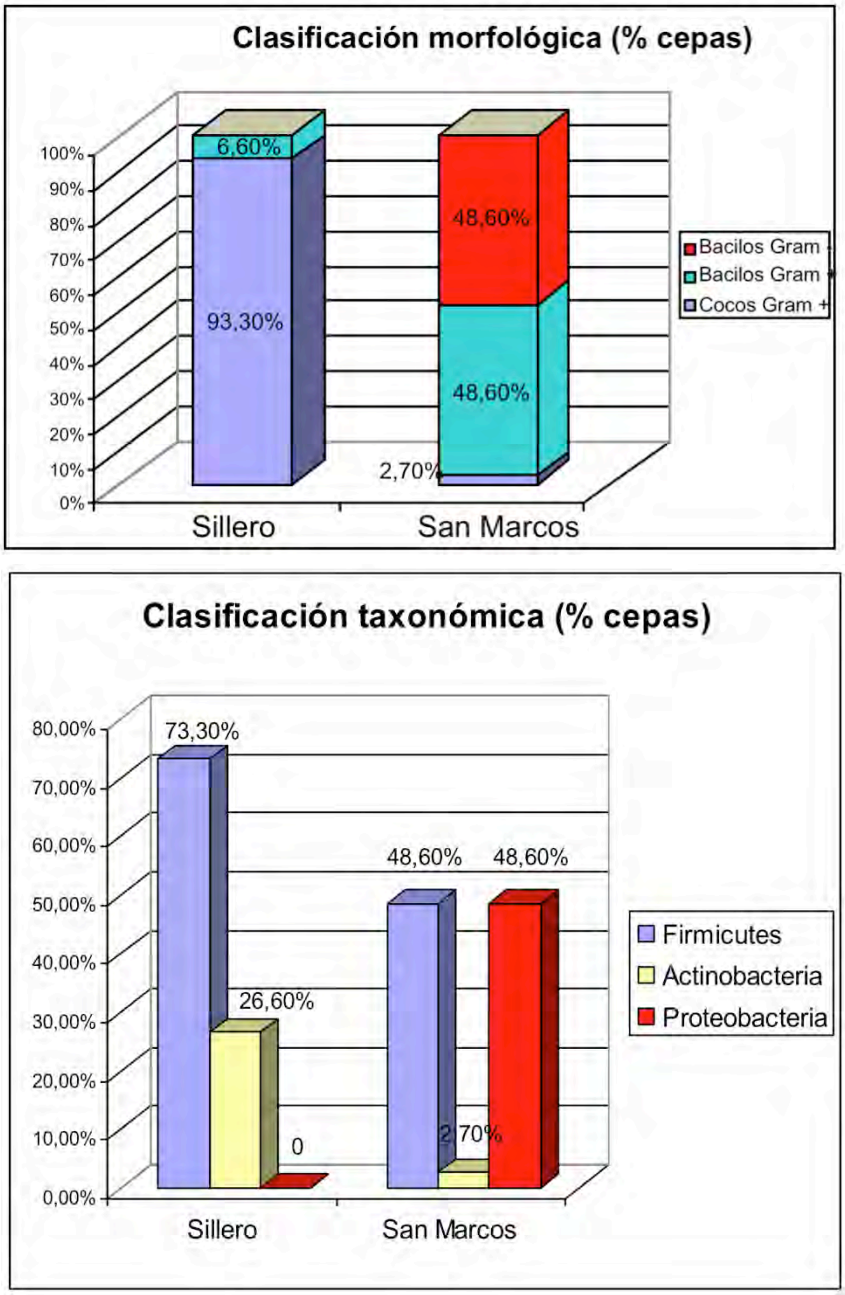

Figura 5. Clasificación morfológica y taxonómica (% cepas).

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

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

BACTERIAS		MUESTRAS	
Phylum	**Géneros/Especies**	**Sillero (N=15)**	**San Marcos (N=37)**
Firmicutes	*Staphylococcus sp.*	6,60%	2,70%
	S. lugdunensis	40,00%	-
	S. warneri	20%	-
	Bacillus sp.	-	8,10%
	B. licheniformis	-	32,40%
	B. mycoides	-	-
	Brevibacillus sp.	6,60%	-
	Paenibacillus thiaminolyticus	-	5,40%
Actinobacteria	*Cellulomonas sp.*	-	-
	Micrococcus luteus	6,60%	-
	Rhodococcus sp.	-	2,70%
	Rothia terrae	20%	-
Proteobacterias	*Acinetobacter lwoffii*	-	5,40%
	Brevundimonas diminuta	-	16,20%
	Brevundimonas vesicularis	-	-
	Cupriavidus pauculus	-	16,20%
	Desulfovibrio sp.	-	5,40%
	Pseudomonas aeruginosa	-	-
	Pseudomonas alcaligenes	-	5,40%

El sondeo Sillero presenta, principalmente, cocos Gram positivos (93,3%) de la especie *Staphylococcus lugdunensis* (40%), seguido de *Rothia terrae* (20%). No se han encontrado bacterias Gram negativas, al igual que en otro manantial mineromedicinal hipertermal (26), debido probablemente a la menor resistencia al calor de estas bacterias. La presencia de *Staphylococcus* en pequeño número, en aguas mineromedicinales es frecuente, procedentes del suelo y el aire (5, 13, 16, 22). Se ha descubierto recientemente que *S. lugdunensis* produce lugdunina, un antibiótico bactericida contra varias bacterias patógenas Gram positivas, resistentes a otros antibióticos, como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus,* lo que puede suponer futuras aplicaciones clínicas (27). *Rothia terrae* es un actinomiceto que ha sido aislado en el suelo (28).

El sondeo San Marcos tiene una mayor diversidad microbiana.Predominan los bacilos Gram positivos de la especie *Bacillus licheniformis* (32,4%), pero también se han encontrado bacilos Gram negativos de las especies *Cupriavidus pauculus* y *Brevundimonas diminuta*(16,2%).

Los bacilos Gram positivos esporulados del género *Bacillus* han sido detectados en numerosos manantiales mineromedicinales (8, 16, 22, 25, 29), procedentes del suelo. La especie *B. licheniformis* crece en medios salinos y está ampliamente distribuido en el suelo y otros ambientes, habiéndose detectado también en el manantial del Balneario de Puente Viesgo (29). También se han identificado dos cepas de *Paenibacillus thiaminolyticus*, esta especie, incluida antes en el género *Bacillus,* es capaz de hidrolizar distintos compuestos orgánicos como el almidón y la tiamina, por lo que puede jugar un papel en la autodepuración de las aguas (30).

Los bacilos Gram negativos aislados pertenecen al *Phylum Proteobacteria* y son no fermentadores lo que es habitual en manantiales extremadamente duros (6, 13, 17). La especie *Cupriavidus pauculus* se encuentra en el agua y, actualmente, tiene un gran interés por su posible uso en biorremediación debido a su resistencia al cobre y otros metales pesados y su capacidad para metabolizar compuestos xenobióticos como el fenol (31). Anteriormente incluida en el género *Ralstonia* como *R. paucula*, fue reclasificada en 2004 e incorporada al género *Cupriavidus* (32). Como hemos indicado anteriormente, las cepas aisladas en este agua mineromedicinal tienen capacidad nitrificante, oxidando compuestos nitrogenados a nitratos, por lo que su presencia puede ser importante en la autodepuración de estas aguas para eliminar el exceso de nitrógeno. Otros autores también han encontrado cepas de *C. pauculus* con esta propiedad (19). Hemos estudiado su sensibilidad a los antibióticos ya que, como patógeno oportunista, en raras ocasiones puede ocasionar infecciones en personas inmunodeprimidas (33, 34). Todas las cepas son sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol y ceftazidima, la mayoría a ciprofloxacino e imipenen y resistentes a amikacina, amoxicilina-clavulánico, gentamicina, ticarcilina, piperacilina y oxacilina. Estos resultados son semejantes a los publicados por Uzodi *et al* (34).

Brevundimonas diminuta, como su nombre indica, es un bacilo pequeño, antes incluido en el género *Pseudomonas,* cuyo hábitat es el agua (35).

Biotapetes

La formación de biotapetes adheridos a superficies es frecuente en ambientes acuáticos, habiéndose encontrado tanto en manantiales mineromedicinales fríos (5,13, 16), como termales (15). Están constituidos por comunidades microbianas complejas de microorganismos procariotas y eucariotas que dependen de las condiciones ambientales (luz, oxígeno, temperatura) y de la composición química del agua. La asociación simbiótica de estos microorganismos tiene muchas ventajas, ya que comparten los nutrientes, se protegen de agentes externos y metabolizan distintos compuestos, por lo que pueden vivir en ambientes desfavorables (36).

Se han estudiado los biotapetes formados en las fuentes donde los agüistas toman agua para los tratamientos hidropónicos procedente del sondeo Sillero y situadas en el patio central del Balneario. Los biotapetes son de color marrón verdoso y aspecto consistente. La identificación de su microbiota se ha realizado estudiando su morfología por técnicas microscópicas, utilizando microscopios de campo claro, campo oscuro, contraste de fase, fluorescencia y electrónico de barrido. Está formado, principalmente, por cianobacterias filamentosas (*Pseudoanabaena*) y en menor proporción, cianobacterias esféricas (*Gloeocapsa*) y algas conjugadas (*Cosmarium*) y verdes (*Chlorella*). Además, hay muchos depósitos de hierro y arcilla (Figura 6).

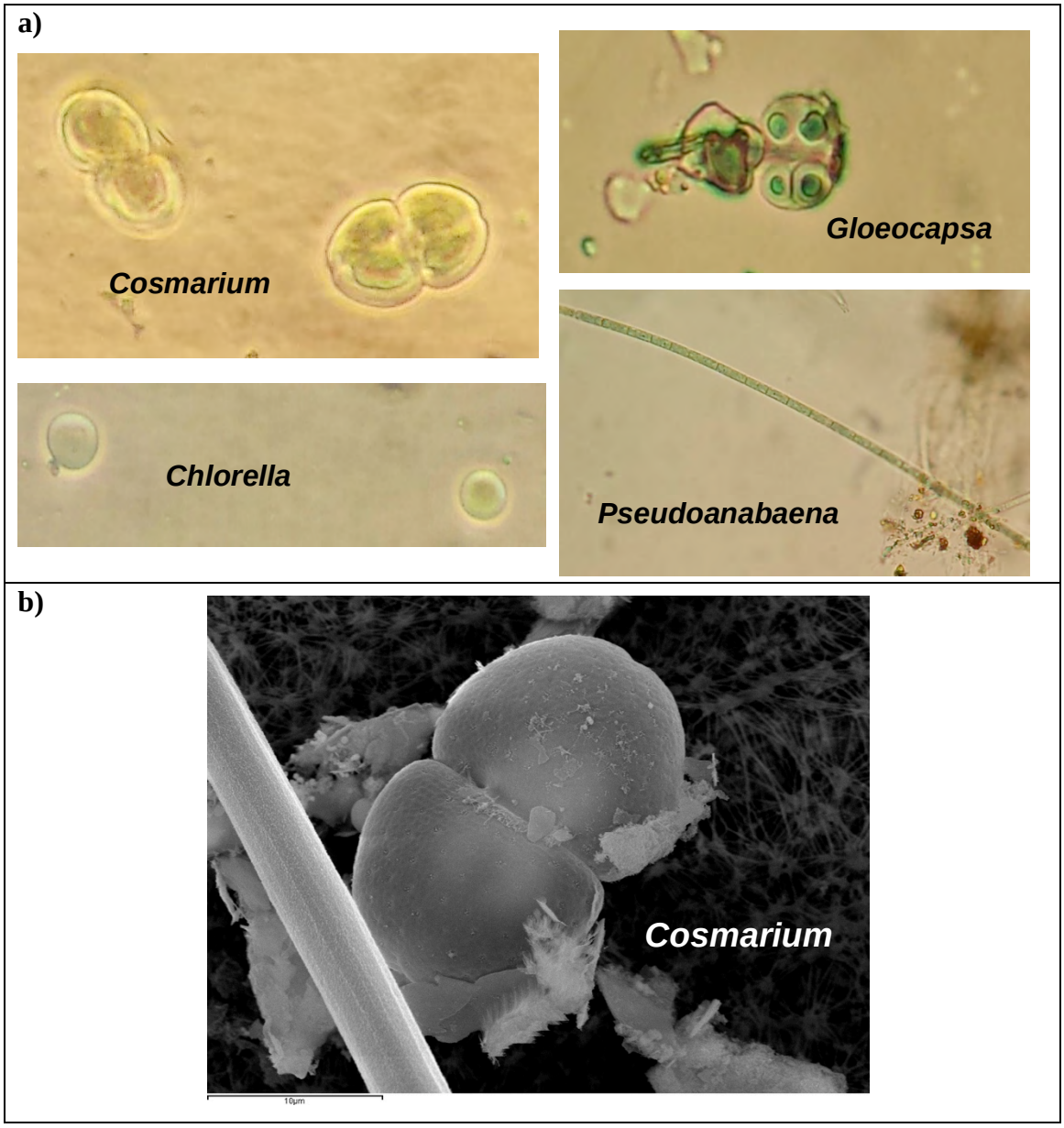

Figura 6. Biotapetes. a) Microscopía óptica de contraste de fases (40x); b) Microscopía electrónica de barrido.

Las algas conjugadas tipo *Cosmarium* están ampliamente distribuidas en las aguas dulces, donde forman parte del plancton y son importantes en la cadena trófica. Se han encontrado en otros biotapetes de aguas mineromedicinales extremadamente duras (5, 13, 16).

El microorganismo componente principal de estos biotapetes es *Pseudoanabaena,* una cianobacteria sin vaina y tabicada que con sus células alargadas, formando largos filamentos, constituye un entramado donde se alojan algunas cianobacterias esféricas y las algas. Biotapetes semejantes se encontraron en el Balneario de Alicún de las Torres (5).

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, Gram positivas, lo que es habitual en los manantiales hipertermales. En el sondeo Sillero, utilizado en los tratamientos, predominan los cocos Gram positivos de la especie *Staphylococcus lugdunensis*. En el sondeo San Marcos hay más diversidad microbiana, siendo las principales especies *Bacillus licheniformis* y *Cupriavidus pauculus.* Se han detectado bacterias con actividad proteolítica, amilolítica nitrificante 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. Jose María Morcillo, las facilidades dadas para la toma de muestras. Además, queremos agradecer a Dª Mª Elena Argüelles Rojo, técnico de laboratorio, su valiosa ayuda en la preparación del material de laboratorio y los medios de cultivo.

5. REFERENCIAS

1. Anónimo. Gaceta de Madrid 19/5/1877, nº 139: 525.

2. Anónimo. Gaceta de Madrid 26/4/1928, nº 117: 474-483.

3. Maraver F, Armijo F. Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. Ed. Complutense. Madrid. 2010.

4. 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: 521-542.

5. 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: 763-780.

6. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Villavieja. An R Acad Nac Farm 2016 (en prensa).

7. Reasoner DJ, Geldreich, E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environ Microbiol 1985; 49: 1-7.

8. Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 207-222.

9. Anónimo. Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero sobre Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 2003; 45: 7228-7245.

10. Oliver JD. The viable nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005; 43: 93-100.

11. Anónimo. Orden de 8 de mayo de 1987. Métodos oficiales de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. BOE 1987; 114: 13964-13973.

12. Anónimo. Water quality. Detection and enumeration of *Legionella*. International Standard ISO 11731. 1998.

13. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C, Mosso, MA. Análisis microbiologíco de las aguas mineromedicinales del Balneario El Raposo. In: Monografía nº 32. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2013; pp 6-26.

14. Mosso MA, de la Rosa MC, Vivar MC, Arroyo G, Díaz F. Microbiología de las aguas mineromedicinales del manantial del Balneario de Lugo. In: Monografía nº 20. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1994; pp 43-52.

15. 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.

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 M C, Pintado C, Rodríguez C. Microbiología del agua mineral del Balneario Villa de Olmedo. An R Acad Nac Farm 2015; 81: 54-63.

19. Ramirez M, Obrzydowski J, Ayers M *et al.*Piruvic oxyme nitrification and copper nickel resistance by a *Cupriavidus pauculus* an active heterotrophic nitrifier-denitrifier. Sci World J 2014; 901702.

20. Guinea J, Sancho J, Pares R. Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados. Ed. Omega. Barcelona. 1974.

21. De la Rosa MC, Mosso M A, Díaz F, Vivar MC. Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales del Balneario de Caldas de Bohí. In: Monografía nº 15. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1989; pp 23-30.

22. Mosso M A, de la Rosa MC, Vivar MC, Medina MR. (1994) Heterotrophic bacterial populations in the mineral Waters of termal springs in Spain. J Appl Bacteriol. 1994; 77: 370- 381.

23. Garrity G. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Second ed. Vol. I. Ed. Springer. New York. 2001.

24. De la Rosa MC, Mosso MA, Díaz, F, Vivar MC, Medina MR. Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales de Fitero. In: Monografía nº 18. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1991; pp: 45-60.

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: 173-183.

26. De la Rosa MC, Mosso MA, Vivar MC, Arroyo G. Microbiología de las aguas mineromedicinales del balneario de Blancafort. In: Monografía nº 21. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 1995; pp: 45-52.

27. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A *et al.* Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. Nature. 2016; 535: 511- 516.

28. Chou YJ, Chou JH, Lin KY *et al. Rothia terrae* sp. Nov. isolated from soil in Taiwan. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58: 84-88.

29. De la Rosa MC, Sánchez MC, Rodríguez C, Mosso MA. Microbiología del manantial mineromedicinal del balneario Puente Viesgo. An R Acad Nac Farm. 2007; 73: 251-265.

30. De Vos P, Garrity G *et al.* Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Second ed. Vol. III. The *Firmicutes.* Ed. Springer. New York. 2009.

31. Watanabe T, Yamazoe A, Hosoyama A *et al.* Draft genome sequence of *Cupriavidus pauculus* strain KF709, a biphenyl-utilizing bacterium isolated from biphenyl contaminated soil. Genome Announc. 2015; 26: 222-315.

32. Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int J Evol Microbiol. 2004; 54: 2285-2289.

33. Balada-Llasat JM, Elkins C, Swyers L, Bannerman T, Pancholi P. Pseudo-outbreak of *Cupriavidus pauculus* infection at an outpatient clinic related to rising culturette swabs in tap water. J Clinic Microbiol. 2010; 48: 2645-2647.

34. Uzodi AS, Schears GJ, Neal JR, Henry NK. *Cupriavidus pauculus* bacteremia in a child on extracorporeal membrane oxygenation. ASAIO J. 2014; 60: 740-741.

35. Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology.Second ed. Vol. II. The *Proteobacteria.* Ed. Springer. New York. 2005.

36. Zamora A, de la Rosa MC, Mosso MA, Guijarro JF, Rodríguez C. Biofilmes, escenarios de biodiversidad. San Mil. 2009; 65: 246-253.