

ESTUDIO 4

Microbiología del agua mineral del balneario

Title in English: *Microbiology of the mineral water of 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 81, Special Issue (2015) pp. 54-63.

RESUMEN

Se ha estudiado la microbiota autóctona y alóctona del agua mineral del Balneario Villa de Olmedo (Valladolid). El número total de microorganismos en el agua ha sido de $4,5 \times 10^3/\text{mL}$ y el número de bacterias viables heterótrofas menor de $5 \text{ ufc}/\text{mL}$. 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 bacilos Gram negativos de la clase *Gammaproteobacteria* (68,5%) y, en menor proporción, por cocos Gram positivos (14,3%). La especie más frecuente ha sido *Pseudomonas stutzeri* (37,2%). Se han detectado bacterias con actividades amonificantes, nitrificantes, proteolíticas y amilolíticas en 100 mL de agua, que contribuyen a la autodepuración del agua.

Palabras clave: Manantial hipotermal; Microbiota autóctona; Biodiversidad; Agua mineromedicinal.

ABSTRACT

The autochthon and alochthon microbiota of the mineral water of the Villa de Olmedo Spa have been studied. The total number of microorganisms in the water was of $4.5 \times 10^3/\text{mL}$ and the number of heterotrophic viable bacteria was lower than $5 \text{ cfu}/\text{mL}$. Neither faecal indicators nor pathogenic microorganisms were found; therefore these waters comply with the Spanish regulations on drinking water. The autochthon microbiota mostly belongs to Gram negative bacilli, from the Class *Gammaproteobacteria* (68.5%) and in smaller percentage to the Gram positive cocci (14.3%). The most frequently found species was *Pseudomonas stutzeri*. Moreover ammonifying, nitrifying, proteolytic and amylolytic bacteria have been detected in 100 mL of water, all of them involved in self-purification process of water.

Keywords: Hypothermal spring; Autochthon microbiota; Biodiversity; Mineral water.

1. INTRODUCCIÓN

El Balneario Villa de Olmedo se encuentra situado en el municipio de Olmedo, en la comarca de Tierra de Pinares, al sur de la provincia de Valladolid, perteneciente

a la comunidad autónoma de Castilla y León. Está construido sobre las ruinas del antiguo monasterio de Sancti Spiritus, uno de los primeros monasterios femeninos españoles, fundado en el siglo XII, del que conserva un patio y la bóveda de la iglesia de estilo mudéjar. Actualmente el Balneario dispone de modernas instalaciones para los distintos tratamientos termales y de un hotel de cuatro estrellas (Figura 1).

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 estudiado, por primera vez en estas aguas mineromedicinales, la microbiota autóctona por su importante papel en la autodepuración de las mismas, con el fin de conocer su diversidad, número, identidad y actividad que depende de las propiedades físicas y químicas de dichas aguas.



Figura 1. Edificio del balneario Villa de Olmedo.

2. RESULTADOS

2.1. Manantial

El Balneario utiliza, principalmente, el agua procedente de un manantial mineromedicinal denominado Sancti Spiritus, nombre del antiguo monasterio. El

punto de emergencia se encuentra en el exterior del Balneario, en una zona ajardinada separada de la piscina, protegido por una pequeña fábrica de obra y una tapa metálica (Figura 2). El agua se capta mediante una bomba y se conduce por tuberías al interior del balneario para su utilización en los distintos tratamientos. Estas aguas mineromedicinales emergen a una temperatura de 22° C, tienen un pH neutro y se clasifican como hipotermales, de mineralización fuerte, clorurada sódica, muy blanda (1).

Para realizar este estudio se tomaron muestras de agua en el punto de emergencia, en mayo del año 2013. 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 2. Punto de emergencia

2.2. Microorganismos totales y vivos

El número de todos los microorganismos presentes en este ambiente acuático, se ha realizado por el método del recuento directo utilizando un microscopio de fluorescencia y varios fluorocromos que nos permiten distinguir los microorganismos muertos de los vivos: naranja de acridina, Syto® 9 y yoduro de propidio del kit

“BacLight Live/Dead”. Las muestras teñidas se filtraron por una membrana Nucleopore de 0,2 µm de diámetro de poro y se observaron con objetivo de inmersión, siguiendo la técnica de Boulos et al. (2).

El número de microorganismos totales ha sido de $4,5 \times 10^3$ / mL, siendo el porcentaje de vivos, 44,4%. Estos resultados son semejantes a los encontrados en otro manantial de agua mineromedicinal clorurado sódico (3), pero ha sido menor el porcentaje de microorganismos vivos.

2.3. Bacterias aerobias viables

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 y dilución en placa, utilizando los medios agar extracto de levadura (4) para las bacterias heterótrofas y agar R2A (5) para las oligotrofas, e incubando a 22° C, tres días y a 37° C, 24 horas, respectivamente. Los resultados se han expresado en unidades formadoras de colonias por mL de agua (ufc/mL).

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

Tª(°C)	Bacterias	Manantial
22°	Heterótrofas	1,4
37°		0,6
22°	Oligotrofas	3,6
37°		0,3

En el punto de emergencia, el número de bacterias viables del agua es muy bajo, menor de 5 ufc/mL, lo que significa que la protección del manantial es adecuada (Tabla 1), presentando más bacterias oligotrofas que heterótrofas, propio de ambientes acuáticos subterráneos pobres en materia orgánica (6). Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles hipotermales (3, 7, 8). 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 no crecen en las

condiciones y medios de cultivo utilizados en el laboratorio y, algunas, se encuentran en el estado de viable no cultivable (9).

2.4. Microorganismos de interés sanitario

Las aguas mineromedicinales se utilizan en los balnearios con fines terapéuticos, por lo que es necesario un control microbiológico periódico, para evitar cualquier riesgo sanitario y deben tener ausencia de bacterias que indiquen contaminación fecal y de microorganismos patógenos, que puedan transmitirse a través del agua.

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 de las aguas de consumo humano (4) y de bebida envasadas (10). También se ha estudiado *Staphylococcus aureus*, filtrando 250 mL de agua, cultivando el filtro en caldo triptona soja y aislando en agar Baird-Parker (11) y *Legionella pneumophila*, según la Norma ISO 11731 (12).

No se han encontrado ninguno de los microorganismos indicadores de contaminación fecal, ni bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano (4) y aguas de bebida envasadas (13).

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) y del nitrógeno (amonificantes, nitrificantes). Se ha utilizado la técnica del número más probable (NMP) y los medios descritos por Pochon y Tardieux (14), 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	4,3 x 10
Amilolíticos	2,4 x 10 ²
Celulolíticos	<3
Amonificantes	>1,4 x 10 ⁴
Nitrificantes	9,3 x 10

El agua ha presentado bacterias proteolíticas, amilolíticas, 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 hipotermales (3, 7, 15, 16, 17, 18). Las bacterias celulolíticas y nitrificantes no suelen detectarse en este tipo de aguas o se encuentran en un número muy bajo (7, 17).

Se han estudiado los microorganismos halófilos moderados, utilizando agar halófilo con 15 % de cloruro sódico (18) e incubando a 30° C, durante 7 días, pero no se han detectado a pesar de que estas aguas son de mineralización fuerte y poseen cloruros y sodio.

También se han estudiado otros tipos de microorganismos constituyentes de la microbiota autóctona de las aguas: 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 % (11). La presencia de algas y cianobacterias se ha determinado filtrando 100 mL e inoculando el filtro en medio Stanier (19), incubando con iluminación controlada a 24° C, durante 30 días. No se han detectado hongos, 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 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 y las galerías Staph para los cocos Gram positivos.

En las muestras estudiadas se han aislado 35 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram

negativos (85,7 %) y cocos Gram positivos (14,3 %) (Tabla 3). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (20, 21) las cepas identificadas pertenecen, en su mayoría, al Phylum *Proteobacteria* (82,8%), y en menor proporción a los Phyla: *Firmicutes* (14,3%) y *Bacteroidetes* (2,8 %) (Tabla 4). La mayoría de los bacilos Gram negativos aislados son no fermentadores (82,8%) y pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (68,5%). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en otros manantiales minerales hipotermales (3, 7,15, 17, 18, 22).

Tabla 3. Clasificación morfológica (% cepas).

Bacterias	Manantial
Bacilos Gram negativos	85,7
No Fermentadores	82,8
Fermentadores	2,8
Cocos Gram Positivos	14,3

Tabla 4. Clasificación taxonómica (% cepas).

Phylum	Clase	Manantial
<i>Proteobacterias</i>		82,8
	Alpha	14,3
	Gamma	68,5
<i>Bacteroidetes</i>		2,8
	<i>Flavobacteria</i>	2,8
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	14,3

Se han aislado varias cepas de bacterias con pigmentos carotenoides y fluorescentes. Es frecuente la presencia de este tipo de bacterias en aguas minerales (7, 18), debido a que los pigmentos carotenoides las protegen de las radiaciones evitando la muerte fotodinámica. Entre ellas, destacamos en estas aguas las especies: *Brevundimonas vesicularis*, *Flavobacterium aquatile*, *Sphingomonas aquatile*, con pigmento carotenoide amarillo y *Pseudomonas fluorescens* que posee un pigmento fluorescente. 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. Se la considera autóctona de las aguas, habiendo sido detectada en otros manantiales hipotermiales (3, 15, 17, 18, 22) y en aguas minerales (23).

En la Tabla 5 se detallan las especies de bacterias Gram negativas aisladas en este agua, siendo *Pseudomonas stutzeri* y *P. alcaligenes* las predominantes. Estas dos especies fueron también las más frecuentes en otro manantial clorurado sódico (3). *P. stutzeri* es una bacteria muy heterogénea tanto en sus propiedades nutricionales como en su genotipo. Se encuentra en el suelo y el agua y sus principales características son la desnitrificación y la utilización del almidón y otros sustratos orgánicos como fuente de carbono (20) por lo que se utiliza en la descontaminación de suelos y aguas residuales (24).

Tabla 5. Géneros y especies de bacterias heterótrofas y oligotrofas (% cepas).

Bacterias	Manantial N=35
<i>Bacteroidetes</i>	2,8
<i>Flavobacterium aquatile</i>	2,8
<i>Proteobacteria</i>	82,8
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,8
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	11,5
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	20,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,8
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	37,2
<i>Sphingomonas aquatile</i>	2,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,8
<i>Firmicutes</i>	14,3
<i>Staphylococcus warneri</i>	8,5
<i>Vagococcus fluvialis</i>	5,7

Los cocos Gram positivos se encuentran en baja proporción y corresponden a los géneros *Staphylococcus* y *Vagococcus* (Tabla 5). Los estafilococos son muy ubicuos y se han detectado en diversas aguas mineromedicinales (7, 15 16, 18, 22). Además se ha aislado *V. fluvialis* cuyo hábitat es el agua dulce y que también hemos encontrado en otros manantiales hipotermiales (8, 25).

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*, 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 a los propietarios del Balneario y en especial a D. Roberto García, 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^a M^a Elena Argüelles Rojo, técnico de laboratorio.

5. REFERENCIAS

1. Maraver, F., Armijo, F. Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. Ed. Complutense: Madrid. 2010
2. Boulos, L.; Prévost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J. & Desjardins, R. Live/Dead BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J Microbiol Method 1999; 37: 77-86.
3. De la Rosa MC, Sánchez MC, Rodríguez C, Mosso, M.A. Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo. An R Acad.Nac Farm 2007; 73: 251-265.
4. 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.
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: 207-222.
7. Mosso M.A, 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.
8. Mosso MA, De la Rosa MC, Díaz F, Vivar C, Medina MR. Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales de Alange. Monografía nº 16. ed. Real Academia Nacional de Farmacia;1990; pp. 28-40.
9. Oliver JD. The viable nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005; 43: 93-100.
10. 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.
11. Anónimo Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association. Washington 1998.

12. Anónimo Water quality. Detection and enumeration of Legionella. International Standard ISO 11731. 1998.
13. Anónimo Real Decreto de 30 de diciembre de 2010 por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano. BOE 2010; 16: 6111-6133.
14. Pochon J, Tardieux P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle. St. Mandé (Seine) 1956.
15. De la Rosa M.C, 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.
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, Sánchez MC, Pintado C, Rodríguez C, De la Rosa MC. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja. An. R. Acad. Nac. Farm. 2008; 74: 505-521.
18. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C, Mosso MA. Análisis microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario "El Raposo". In: Monografía nº 32. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia 2013; pp 6-26.
19. Stanier R, Adelberg E, Ingraham J. Microbiología. Reverté. Barcelona 1984.
20. Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Second ed. Vol. II. The Proteobacteria. Part B and C. Springer. New York 2005.
21. Whitman W. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Second ed. Vol. III. The Firmicutes. Springer. New York 2009.
22. De la Rosa M C, 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.
23. Leclerc H, Da Costa M. Microbiology of natural mineral waters. In: Technology of Bottled water. 2ª Ed. Blacwell Publishing. Boston. 2004.
24. Busquets A, *et .al.* Draft Genome Sequence of Pseudomonas stutzeri Strain B1SMN1, a Nitrogen-Fixing and Naphthalene- Degrading Strain Isolated from Wastewater. Genome Announc 2013 1: 584-13.
25. De la Rosa M C, Mosso M.A, Prieto MP. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario "El Paraíso" de Manzanera (Teruel). An R Acad Nac Far 2001; 67: 173-183.